

SERIE E

N° 131

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE CLERMONT
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Rose GALZY

RECHERCHES SUR LA CROISSANCE DE LA VIGNE SAINE ET COURT-NOUEE CULTIVEE «IN VITRO»

Soutenue le Juillet 1970 devant la commission d'examen

M. L'HERITIER

Président

M. CHAMPAGNAT

M. LARPENT

M. HIRTH

}

Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548424_0001

SERIE E

N° 131

THESE

PRESENTEE

A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE CLERMONT
POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Rose GALZY

RECHERCHES SUR LA CROISSANCE DE LA VIGNE SAINE ET COURT-NOUEE CULTIVEE «IN VITRO»

Soutenue le Juillet 1970 devant la commission d'examen

M. L'HERITIER

Président

M. CHAMPAGNAT

M. LARPENT

M. HIRTH

}
Examineurs



A V A N T - P R O P O S

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur L'HERITIER, qui m'a aidé de ses conseils pour la rédaction de ce mémoire, et qui a bien voulu accepter la présidence du jury de thèse.

Monsieur le Professeur CHAMPAGNAT s'est intéressé à mon travail avec beaucoup de bienveillance. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude.

Je n'oublie pas que Monsieur le Professeur HIRTH m'a initiée aux méthodes de la virologie, au cours d'un stage que j'ai fait à l'Institut PASTEUR, en 1955 et 1956. Depuis cette époque, il n'a jamais cessé de m'apporter ses encouragements, et je suis heureuse de lui exprimer ici toute ma reconnaissance.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur LARPENT qui a accepté de juger mon mémoire.

Que Monsieur CORNUET, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A. trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Monsieur et Madame COMPAN m'ont apporté leur collaboration dévouée tout au long de ce travail; qu'ils soient assurés de ma gratitude.

Que toutes les personnes du C.R.A.M. et de l'E.N.S.A.M. qui m'ont aidé au cours de mon travail soient assurées de ma reconnaissance, en particulier l'équipe du laboratoire de Génétique.

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE CLERMONT

DOYEN : M. KOHLMULLER Robert

ASSESEUR : M. CHADEYRAS Marcel

PROFESSEURS

M. RAMBAUD René	Chimie
M. BLANC Eugène	Mathématiques pures
M. ROQUES Maurice	Géologie
M. LAPADU-HARGUES	Minéralogie
M. LUTZ Hubert	Biologie Animale
M. RAOULT Gaston	Physique
M. CHAMPAGNAT Paul	Physiologie Végétale
M. DUPLESSIS-KERGOMARD Alain	Chimie
M. AVAN Jean-Louis	Physique Expérimentale
Mme HENNEQUIN Françoise	Mathématiques Pures
Mlle BERTHET Ginette	Physique
M. LOISEAU Jean	Botanique
M. COMBE René	Physique
M. DE PUYTORAC Pierre	Zoologie
Mme AVAN Madeleine	Physique
Mlle DONDON Marie-Louise	Chimie Physique
M. DELOST Paul	Physiologie Animale
M. VIALARD André	Chimie
M. KOHLMULLER Robert	Chimie minérale
M. GUILLAUME Marcel	Algèbre
M. COMBE Jean	Physique
M. HENNEQUIN Paul	Mathématiques Appliquées
M. L'HERITIER Philippe	Génétique
M. VESSIERE Roger	Chimie Organique
M. BAILLAUD Lucien	Botanique
M. JOYON Louis	Zoologie I.U.T.
M. BERNARD Maurice	Physique

PROFESSEUR ASSOCIE

M. ROCCOS Pantelis

Mathématiques Pures

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. PETERLONGO Jean-Marc

Géologie

M. BATHIER Marcel

Physique

Mlle. DUCHER Suzanne

Chimie

M. FALGAS Maurice

Mathématiques Pures

M. ROCHE Jean

Physique I.U.T.

M. MARTINET Pierre

Chimie

M. MAISONNEUVE Jacques

Géologie

M. CAPESTAN Michel

Chimie

M. LENOIR Marcel

Mathématiques Pures

M. THOMAS Jean

Physique

M. ISABELLE Didier

Physique

M. CAUBERE Paul

Chimie

M. SOULAGE René

Géophysique Générale

M. COURDURoux Jean-Claude

Botanique

MAITRES DE CONFERENCES

M. DUFaure Jean-Pierre

Zoologie

M. BADRIKIAN Albert

Mathématiques Appliquées

M. GRAIN Jean

Zoologie

Mme BESSERRE Anne-Marie

Mathématiques Pures

M. JEAN Claude

Physiologie Animale

M. LE THAN PHONG

Mathématiques Pures

M. MIGNOT Jean-Pierre

Zoologie

M. VELLEy Georges

Psycho-Physiologie

M. COUSSEINS Jean-Claude

Chimie

M. LEMaIRE Jacques

Chimie

M. CHADEYRAS Marcel

Mathématiques Pures

M. BOILLAT Guy

Mathématiques Pures

M. CADORET Robert

Physique

M. LE MEN François

Physique

M. GAGNY Claude

Géologie

M. LEVY Philippe

Génie Electrique I.U.T. MONTLUCON

M. PRORIOI Joseph	Génie Mécanique I.U.T. MONTLUCON
M. ROCHE Guy	Génie Electrique I.U.T. MONTLUCON
M. GUILLLOT Albert	Biologie Appliquée I.U.T. CLERMONT
M. FANGUIN René	Physique I.U.T.
M. NIGOND Jacques	Agronomie I.U.T. CLERMONT
M. LARPENT Jean-Paul	Microbiologie Appliquée C.U.S.T.
M. BESSERRE Daniel	Spectroscopie C.U.S.T.
M. ACKERMANN Patrick	Electronique Automatique C.U.S.T.
M. LHOMME Jean	Chimie des Substances naturelles C.U.S.T.
M. AUSLENDER Alfred	Mathématiques Appliquées

CHARGES d'ENSEIGNEMENT .

M. COFFI N'KETSIA Barben Jean	Mathématiques Pures
M. LETAC Gérard	Mathématiques et Informatique I.U.T. CLERMONT

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

Mme PAVEL Liliane	Mathématiques I.U.T. CLERMONT
-------------------	-------------------------------

ATTACHEE PRINCIPALE

Mme CHOPART Marie-Louise

INTRODUCTION

Le court-noué , maladie à virus de la vigne , est connu depuis très longtemps dans la plupart des pays viticoles . Il a fait l'objet d'un grand nombre de descriptions et de travaux scientifiques . On a pu , en effet , rassembler sur ce sujet une bibliographie comportant plus de mille titres (CAUDWELL , 1965) . Nous ne rappellerons ici que quelques-unes des grandes étapes qui ont marqué l'évolution des connaissances sur le court-noué de la vigne . D'après des références anciennes , citées par RAVAZ , on peut penser que les viticulteurs français connaissaient le court-noué depuis le milieu du 19ème siècle au moins . Dans le même mémoire , RAVAZ décrit de façon détaillée les caractères des vignes court-nouées (RAVAZ , 1900) . A cette époque , on savait déjà que la maladie pouvait se transmettre par le sol (RATHAY , 1882) . Un peu plus tard , un auteur italien , étudiant les caractères anatomiques du court-noué , a mis en évidence l'existence de cordons endocellulaires chez les vignes malades (PETRI , 1911) .

Le court-noué a d'abord été attribué aux causes les plus diverses . Cependant , aux environs de 1930 , plusieurs auteurs formulaient déjà l'hypothèse qu'il pouvait s'agir d'une virose (PETRI , 1931 - ARNAUD , 1931) . La transmission de la maladie par le greffage venait à l'appui de cette

hypothèse . Ce caractère essentiel de la maladie , signalé très tôt (PAN-TANELLI , 1911 - RAVAZ , 1928) a été ensuite confirmé par de nombreux auteurs entre 1945 et 1955 . (BRANAS , 1948 - COSMO , 1953 - HEWITT , 1945 - VUITTENEZ , 1952) . Ces travaux ont permis d'établir de façon pratiquement irréfutable la nature virale du court-noué de la vigne .

A partir de 1960 environ , les méthodes de la virologie ont pu être appliquées à l'étude du court-noué . Deux découvertes importantes datent en effet de cette époque . D'une part , le vecteur de la maladie a pu être identifié . Il s'agit de Xiphinema index THORNE et ALLEN , un nématode ectoparasite des racines de la vigne (HEWITT , RASKI et GOHEEN , 1958) . D'autre part , le virus du court-noué a été transmis pour la première fois à des plantes herbacées , isolé et observé au microscope électronique (CADMAN , DIAS et HARRISSON , 1960) .

Il devenait donc possible d'étudier les diverses souches du virus par des méthodes sérologiques (HEWITT et TAYLOR , 1963 - VUITTENEZ , 1963) . Ces études ont d'abord porté sur des extraits de plantes herbacées préalablement contaminées par voie mécanique . Plus récemment , enfin , le virus a pu être isolé à partir de tissus de vigne (VUITTENEZ et KUSZALA , 1968) . A côté du court-noué (ou fanleaf) les auteurs distinguent actuellement plusieurs virus susceptibles d'être hébergés par la vigne (HEWITT , 1968) .

Les progrès réalisés depuis 10 ans dans la connaissance des viroses de la vigne ont naturellement permis d'améliorer beaucoup les méthodes de lutte contre le court-noué . Les efforts pour limiter l'extension de cette maladie se sont développés simultanément dans plusieurs domaines . La recherche de plantes indemnes de virus par sélection visuelle a été poursuivie . Mais on a pu également créer du matériel sain par de nouvelles méthodes telles que la thermothérapie (GIFFORD et HEWITT , 1961 - GALZY , 1961) . Enfin , la connaissance du vecteur de la maladie a permis d'établir le matériel sélectionné , dans des sols non contaminants .

Parmi les différents problèmes posés par la lutte contre les viroses de la vigne , c'est la production de matériel végétal non virosé , qui a retenu toute mon attention . Il m'a semblé qu'en plus de leurs applications pratiques , ces recherches présentaient un intérêt du point de vue fondamental . Elles se rapportent , en effet , à des phénomènes biologiques importants , notamment

dans le domaine des relations hôte-virus . On sait que , chez une plante viroisée , certaines cellules échappent parfois à l'invasion virale . Ainsi , au cours de la multiplication cellulaire , un organe sans virus peut se former : méristème , embryon , bourgeon , etc... On a démontré par exemple la répartition hétérogène du virus de la mosaïque du tabac dans des colonies tissulaires de tabac cultivées in vitro : 38 p. 100 seulement des cellules provenant de cals infectés hébergeaient le virus (SAMPATH , LUTZ et HIRTH , 1966) . Des phénomènes analogues se traduisant par une invasion virale incomplète ont également été signalés chez des plantes entières (KUNKEL , 1939, MARAMOROSCH , 1949) et pour des virus d'insectes (L'HERITIER, 1958) . Ils peuvent conduire à la création d'individus sains à partir d'organismes virosés . Cette possibilité a été exploitée par les phytopathologistes . Ainsi , la culture des méristèmes mise en pratique , d'abord par MOREL (MOREL et MARTIN , 1952) est actuellement utilisée à l'échelle industrielle pour la création de plantes indemnes de virus .

Plusieurs sortes de facteurs peuvent favoriser l'élimination du virus d'une partie ou de l'ensemble de son hôte . Il peut s'agir de facteurs physiques . Dans d'autres cas , ce sont les caractéristiques biologiques de certaines cellules qui paraissent s'opposer à l'expansion du virus (cas de méristèmes, d'embryons ou de cellules réfractaires à l'infection virale telles que celles isolées par SAMPATH et Al à partir de tissus de tabac .) On sait , d'autre part , que certaines plantes sont capables de répondre à la contamination par la formation d'une substance anti-virus (KASSANIS , 1963 - SELA , 1964) . Parmi les facteurs physiques défavorables à la multiplication des virus on peut citer les températures élevées . Leur action a été souvent démontrée , aussi bien dans le cas des virus animaux (LWOFF, 1958 - BRUN, 1963), que chez les plantes où cette propriété a fait l'objet d'un grand nombre d'applications . La thermothérapie a permis d'obtenir la guérison de nombreuses viroses . Dans certains cas cependant , seules les extrémités des axes développés à température élevée se trouvent indemnes de virus . On peut alors prélever ces extrémités et les bouturer (QUAK , 1957) . Ces différentes techniques font l'objet de revues générales assez fréquentes (HOLLINGS , 1965 - NYLAND et GOHEEN , 1969) .

Compte - tenu de ces éléments , j'ai fixé comme but à mon travail l'étude , chez la vigne court-nouée , des relations hôte-virus dans différentes conditions de température et de milieu nutritif . Ces recherches ont présenté deux aspects principaux .

Il était tout d'abord indispensable de disposer d'une méthode permettant de cultiver la vigne en conditions entièrement contrôlées . J'ai donc été amenée dans un premier temps , à mettre au point la culture in vitro de différents organes : les embryons , les bourgeons axillaires et les apex . Une méthode permettant de chiffrer le développement d'un lot de plantes cultivées in vitro à été adoptée et appliquée tout au long de ce travail . Ainsi , au cours de la mise au point des méthodes de culture , on a pu étudier systématiquement l'action de certains éléments du milieu nutritif (substances de croissance , saccharose , vitamines , éléments minéraux) sur l'enracinement et la croissance des boutures de vigne .

Par la suite , grâce à ces méthodes expérimentales , il a été possible d'aborder l'étude des plantes virosées dans le but de préciser certains aspects des relations hôte-virus . La culture in vitro de bourgeons isolés prélevés sur des vignes malades a permis d'étudier d'abord la répartition du virus à l'intérieur de la plante . Des zones sans virus ont pu être mises en évidence . D'autre part , il était important d'étudier l'action de la température sur la virose , On a donc comparé systématiquement la croissance des boutures saines et courtonnées à différentes températures . Ce travail a permis de préciser , pour chaque température , l'action de la virose sur le développement de l'hôte . Il a été possible de définir des conditions précises de culture assurant l'élimination du virus chez les plantes cultivées in vitro .

Tout au long de ce travail se sont dégagées diverses possibilités d'applications agronomiques . On peut , par exemple , créer des plantes saines par thermothérapie , par culture de bourgeons sans virus isolé in vitro , ou , éventuellement , par culture de méristèmes . De même , le bouturage en conditions stériles peut aider à résoudre les problèmes posés par la conservation et la multiplication des plantes indemnes de virus .

LA CULTURE IN VITRO DES ORGANES DE LA VIGNE

La réalisation d'un travail sur le court-noué de la vigne présentait des difficultés liées à la nature arbustive de la plante hôte . Son grand développement et son rythme végétatif annuel se prêtent mal à la culture dans des conditions parfaitement contrôlées . Pour la plupart des expériences , il a été possible d'éviter cet inconvénient en faisant appel à la culture in vitro . Des plantes ont pu être obtenues en culture stérile à partir d'un bourgeon latent , d'un embryon , ou d'un sommet végétatif en cours de croissance .

I - METHODES UTILISEES POUR L'OBTENTION ET L'ETUDE DES CULTURES « IN VITRO »

A . MISE EN CULTURE ET MULTIPLICATION PAR BOUTURAGE .

La préparation des milieux nutritifs et la mise en culture du matériel végétal se font selon les techniques habituelles des cultures de tissus . (MOREL 1948) . Les détails de la méthode peuvent cependant varier selon la nature de l'organe prélevé : embryon , bourgeon latent provenant d'un rameau herbacé ou aouté , bouture terminale ... Des descriptions détaillées ont été fournies pour chacun de ces cas . (GALZY et GALZY 1964 - GALZY 1964 et 1970) .

L'organe mis en culture se développe généralement pour donner une plante entière qui pourra , par la suite , être multipliée par voie végétative in vitro . Il suffit pour cela de prélever stérilement la tige , de la découper en boutures portant chacune une feuille à leur sommet et de planter chaque bouture dans un nouveau tube de milieu nutritif . (figure I) . Cette méthode permet de conserver des clones de vigne in vitro de façon apparemment indéfinie . Certains sont maintenus dans ces conditions depuis plus de 10 ans .

Les plantes sont entreposées dans des enceintes climatisées dont la température est réglable avec une erreur maximum de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Plusieurs de ces enceintes ont été décrites (GALZY , 1964 ; GALZY et NIGOND 1968) . La température la plus utilisée est celle de 20°C obtenue dans une pièce de culture climatisée . Les diverses enceintes réglables entre $+ 15^{\circ}\text{C}$ et $+ 40^{\circ}\text{C}$ sont munies d'un éclairage d'environ 2500 lux , fonctionnant pendant 12 heures par jour . Par contre , les expériences à basse température (entre $+ 2^{\circ}\text{C}$ et $+ 10^{\circ}\text{C}$) ont été réalisées dans des pièces obscures .

Notons enfin que l'atmosphère à l'intérieur des tubes de culture est généralement saturée d'humidité .

B . METHODE D'ETUDE DE LA CROISSANCE IN VITRO .

Une méthode permettant d'étudier la croissance d'un lot de boutures a été adoptée et utilisée dans la plupart des expériences . Chaque condition expérimentale était appliquée à un lot de 30 à 50 boutures . L'enracinement et la croissance de ces boutures étaient suivis avec soin . La longueur des racines était notée , d'abord chaque jour pendant la période d'émission des racines , puis une fois par semaine jusqu'au 40ème ou au 90ème jour , selon que la croissance était plus ou moins rapide . L'allongement des tiges était suivi , de la même façon , pendant 100 à 130 jours . Ces notations permettent d'établir la courbe représentant les fréquences cumulées de boutures enracinées en fonction du temps ainsi que les courbes de croissance moyennes des tiges et des racines . On a parfois noté également le nombre total de racines apparues sur chaque bouture . Pour la présentation des résultats on a généralement retenu cinq critères qui permettent de rendre compte du développement d'un lot de boutures :



Fig. 1 - Exemples de cultures de vigne obtenues *in vitro* à partir de différents organes.

A - *Vitis vinifera* var. Chasselas. Plante obtenue à partir d'une culture de bourgeon.

B - Plantes obtenues à partir de cultures de bourgeons. De gauche à droite : 110 Richter, hybride *V. berlandieri* x *V. rupestris*, *Vitis rotundifolia* et 44-53 Malègue, hybride *V. riparia* x (*V. cordifolia* x *V. rupestris*).

C - Plante obtenue à partir d'une culture de bourgeon.

a. Le pourcentage final de boutures enracinées , c'est à dire le pourcentage observé après 30 jours de culture dans le cas le plus général .

b. La vitesse moyenne d'émission des racines établie selon une méthode mise au point pour l'étude de la vitesse de débourrement des bourgeons de la vigne (NIGOND , 1967) . L'inverse du temps (exprimé en jours) nécessaire à l'enracinement de chaque bouture représente la vitesse d'enracinement de cette bouture . Une vitesse nulle est affectée aux boutures non enracinées après 35 jours . La moyenne de ces valeurs représente la vitesse d'enracinement du lot de boutures . Cette vitesse est multipliée par 100 pour faciliter les calculs et l'établissement des graphiques . Le temps moyen d'émission des racines exprimé en jours sera égal à l'inverse de la vitesse moyenne . Les boutures cultivées sur le milieu nutritif habituel présentent en général une seule racine . Dans les cas où 2 racines sont apparues il n'est tenu compte que de la première pour le calcul de la vitesse d'enracinement .

c. La vitesse maximale moyenne de croissance des racines exprimée en mm par jour . La courbe de croissance moyenne d'un lot de boutures est établie et la pente est calculée pour la partie rectiligne de la courbe . Seules les plantes présentant une racine sont prises en considération pour ce calcul .

d. La vitesse maximale moyenne de croissance des tiges calculée de la même façon , pour les plantes enracinées .

e. Enfin , dans le cas des boutures terminales , il a paru utile de tenir compte également du temps de latence qui s'écoule entre la mise en culture et le début de la croissance linéaire des tiges . Cette valeur est déterminée à partir de la courbe de croissance moyenne des tiges d'un lot .

C . REMARQUES GENERALES

La multiplication de la vigne par bouturage stérile in vitro permet de disposer à tout instant de matériel végétal produit dans des conditions de milieu bien définies et reproductibles . Ainsi les clones constituant notre matériel expérimental étaient toujours cultivés sur le milieu de référence contenant les solutions de KNÖP et de BERTHELOT , du saccharose et six vitamines . Ils étaient conservés à 20°C et éclairés pendant 12 heures par jour . Des boutures prélevées sur ces stocks pouvaient , selon les besoins de l'expérimentation , être plantées sur des milieux nutritifs divers et placées à la température voulue .

Il est important de souligner que les plantes ainsi cultivées in vitro et soumises à des températures et des durées d'éclairement constantes , ne manifestent aucun rythme endogène apparent . On n'observe pas d'arrêt de croissance , et l'aptitude à l'enracinement des boutures paraît demeurer constante en fonction du temps . La multiplication végétative peut donc être réalisée tout au long de l'année . Ainsi la culture in vitro permet-elle de résoudre au moins en partie les difficultés expérimentales liées à la nature arbustive de la plante étudiée . Elle permet d'étudier l'action de certains facteurs (température éléments nutritifs , virus) sur la rhizogénèse et la croissance .

Le bouturage in vitro peut également présenter un intérêt dans le domaine de la technique viticole . D'une part , il constitue un moyen commode pour conserver des clones de vigne à l'abri des contaminations virales pendant de longues périodes . D'autre part , il peut permettre la multiplication rapide du matériel végétal . Si la température de culture est bien choisie , le nombre de plantes peut en effet être multiplié par 10 tous les 3 mois , et cela en toutes saisons . Il est ensuite facile de transférer les plantes , d'abord en serre , puis en plein champ . Cette technique peut donc permettre la création rapide , à partir de quelques tubes , d'un grand nombre de plantes destinées , soit à l'expérimentation en plein champ , soit à la production .

II - CULTURE DES EMBRYONS DE VIGNE

Quelques expériences réalisées au début de ces recherches ont permis de mettre au point la culture des embryons de vigne . Leur développement a pu être obtenu sur le milieu de référence additionné de 10% de lait de coco . Après deux mois de culture sur ce premier milieu , les plantules peuvent poursuivre leur croissance en l'absence de lait de coco . Il est possible par la suite de les multiplier par bouturage . De façon générale , elles présentent les mêmes possibilités expérimentales que les cultures de bourgeons de vigne .

Cette méthode de culture a permis de faire quelques observations relatives à l'action des températures élevées sur le caractère "panachure blanche" d'origine monogénique que l'on rencontre chez certaines vignes obtenues par autofécon-

dation . L'expression de ce caractère est sous la dépendance étroite des conditions de milieu . En effet , cultivés à 20°C , les mutants homozygotes présentent des feuilles panachées vertes et blanches . Mais , cultivés à 35°C , ils ne forment que des organes verts . Cependant , l'action de la température 35° est parfaitement réversible . Après un séjour , même prolongé , à 35° , les plantes conservent la possibilité de former des feuilles panachées dès leur retour à 20° .

La culture in vitro des embryons de vigne pourrait se prêter à d'autres expérimentations . Il serait possible , par exemple , d'étudier par ce moyen , la transmission par la graine des viroses de la vigne .

III - CULTURE DES BOURGEONS DE VIGNE

Un milieu nutritif mis au point en 1960 a permis la culture et la multiplication prolongée in vitro de quarante variétés de vigne environ . Il s'agit d'espèces américaines (Vitis rupestris et V. riparia) , d'hybrides interspécifiques et de plusieurs variétés de Vitis vinifera . Ce milieu nutritif à base de solution de KNOP (milieu de référence) a donné des résultats satisfaisants dans la plupart des cas étudiés . Il était néanmoins nécessaire de préciser certains aspects de la nutrition des boutures de vigne ainsi maintenues en culture sur milieu synthétique . Notons dès maintenant que le comportement des bourgeons de vigne est différent selon qu'ils proviennent de plantes établies en plein champ ou de plantes cultivées in vitro à température constante . Dans le premier cas l'enracinement et la croissance peuvent varier de façon considérable avec la date du prélèvement . Dans le second cas , au contraire , les résultats obtenus sont très constants . C'est pourquoi les recherches relatives à l'action du milieu sur le développement des boutures de vigne ont toujours porté sur des plantes ayant déjà subi au moins un bouturage in vitro .

A . CULTURE DE BOURGEONS PRELEVES SUR UNE SOUCHE DE VIGNE ETABLIE EN PLEIN CHAMP .

La culture in vitro se prête assez mal à l'étude du développement des bourgeons prélevés sur la souche de vigne cultivée en conditions normales . Les

difficultés rencontrées dans la stérilisation du matériel végétal gênent considérablement l'expérimentation . Néanmoins , un certain nombre d'observations ont été faites . Elles ont permis de déterminer les conditions les plus favorables à la mise en culture du matériel destiné à être conservé et étudié in vitro . La première culture in vitro d'un clone de vigne est faite à partir de fragments de mérithalles portant un bourgeon latent à leur sommet . Placés sur le milieu de référence et maintenus à 20°C, ces bourgeons peuvent présenter une rhizogénèse et une croissance très variables selon leur état physiologique au moment du prélèvement . D'une façon générale , on assiste d'abord à un début de croissance du bourgeon , puis à l'émission des racines . Chez Vitis rupestris le développement le plus rapide est obtenu pour des bourgeons prélevés , avant l'établissement de la dormance , sur les parties herbacées des rameaux . Dans ces conditions on peut observer la croissance des tiges à partir du 10^{ème} jour de culture et l'émission des racines à partir du 17^{ème} jour environ . La vitesse d'émission des racines est alors maximale (de l'ordre de 5) . On doit souligner que cette vitesse est toujours inférieure à celle observée lorsque les boutures sont prélevées sur une plante cultivée in vitro (elle est alors comprise entre 8 et 9) . Plusieurs facteurs sont susceptibles de modifier la vitesse d'émission des racines chez les boutures prélevées en plein champ , notamment l'époque du prélèvement et le niveau du bourgeon sur le rameau en cours de croissance . On remarque , en particulier , que dans nos conditions de culture , il est très rare d'obtenir l'enracinement des bourgeons prélevés pendant la période de dormance maximale .

Les clones de vigne destinés à être étudiés en culture in vitro ont donc été mis en culture de préférence en mai ou juin . Les bourgeons étaient prélevés sur les parties jeunes des rameaux , à l'exclusion toutefois de la zone terminale correspondant aux deux premières feuilles étalées . Cependant , des prélèvements systématiques sur toute la longueur des rameaux et à différentes époques ont dû être effectués pour étudier la répartition du virus du court-noué à l'intérieur de la plante hôte .

B . CULTURE PROLONGEE IN VITRO DE CLONES DE VITIS RUPESTRIS MULTIPLIES PAR BOUTURAGE . ETUDE DES BESOINS NUTRITIFS .

Le bouturage sur le milieu de référence permet de disposer de lots de plantes importants . Ce matériel a été utilisé pour étudier certains aspects des besoins nutritifs de la vigne cultivée in vitro (GALZY 1969 b) . D'une part , il a paru

interessant de préciser dans quelle mesure ces boutures se comportaient comme des plantes autotrophes . D'autre part , il était important de distinguer , dans la mesure du possible , les besoins nutritifs correspondant à chaque stade du développement des boutures : émission des racines , croissance des racines , croissance des tiges . Il était , en effet , nécessaire de pouvoir agir sur ces différents phénomènes en modifiant la composition du milieu de culture . Il est parfois difficile , par exemple , d'obtenir l'enracinement de toutes les boutures mises en culture . Certaines variétés , ainsi que les clones atteints d'une forme grave de court-noué , présentent en effet une mauvaise rhizogénèse . Pour cette raison , l'étude du milieu nutritif a porté essentiellement sur les facteurs susceptibles d'exercer une action favorable sur la différenciation ou la croissance des racines (certains éléments minéraux et des vitamines) . Ce travail avait également pour but de préparer une recherche ultérieure sur la culture des méristèmes de vigne , technique pour laquelle l'enracinement est aussi un facteur essentiel de réussite .

I) Rôle du saccharose et des vitamines .

Des expériences ont été réalisées afin de préciser les conséquences de la suppression des vitamines ou du saccharose dans le milieu de référence , les plantes étant maintenues soit à 20°C , soit à 35°C . Ce travail a porté sur un clone non virosé de Vitis rupestris var. du Lot . Il a permis de constater que , dans nos conditions de culture , les boutures comportant une feuille étalée , ne sont pas entièrement autotrophes . (figure 2) .

En l'absence de sucre , en effet , la vitesse de croissance des tiges est réduite de moitié dès la première culture . Les vitesses d'émission et de croissance des racines diminuent à partir de la deuxième culture sur un milieu sans sucre .

L'absence de vitamine se traduit par l'apparition de nécroses à l'extrémité des racines lorsque le milieu de culture contient du saccharose . A 20°C , la plante parvient à surmonter cette crise . Vers le 20ème jour on assiste , en effet , à un arrêt de la croissance des racines , mais la croissance des tiges se poursuit et , vers le 80ème jour , lorsque celles-ci portent plusieurs feuilles , de nouvelles racines apparaissent . La plante se rétablit alors totalement . A 35°C , au contraire , les nécroses apparaissent de façon plus précoce et la croissance de la plante est très réduite sur les milieux sans vitamine . Il serait intéressant d'expliquer cette différence de métabolisme entre les cultures maintenues à 20° et à 35° . On sait que les vitamines du groupe B , nécessaires (fig.3)



Fig.2 - A - Plantes de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* à 20° C depuis quatre mois sur des milieux nutritifs contenant des sels minéraux et du saccharose.

A droite, milieu avec vitamines. A gauche, milieu sans vitamine.

B - Plantes de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* à 20°C depuis sept mois sur des milieux nutritifs contenant des sels minéraux mais privés de saccharose.

A droite, milieu avec vitamines, A gauche, milieu sans vitamine.

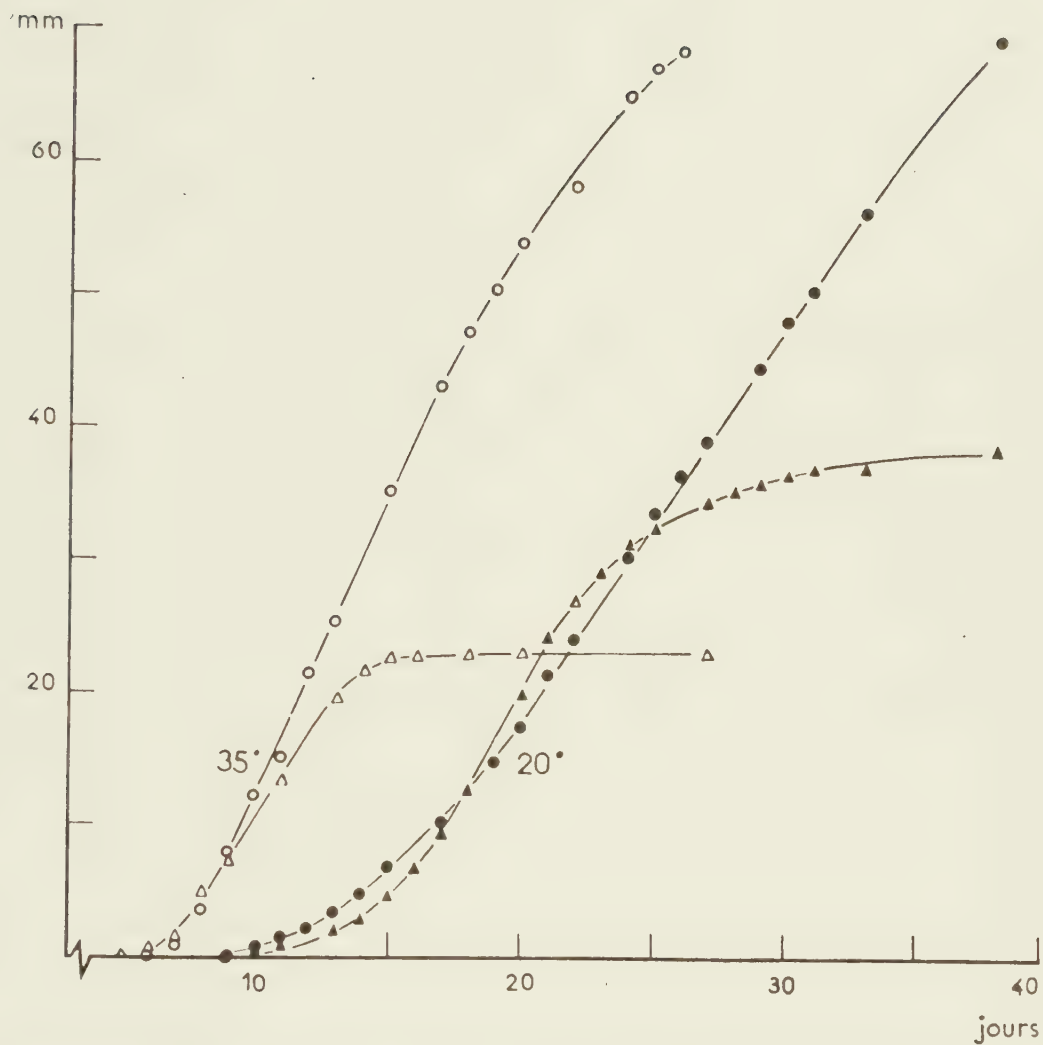


Fig. 3 Comparaison de la croissance des racines de *Vitis rupestris* cultivé *in vitro* à 20° et à 35° C.

○ Milieu avec sucre et vitamines à 35° C. ● Milieu avec sucre et vitamines à 20° C. △ Milieu avec sucre, sans vitamine, à 35° C. ▲ Milieu avec sucre, sans vitamine, à 20° C.

à la croissance des racines , interviennent dans le fonctionnement de certains enzymes . La thiamine , sous forme de pyrophosphate fait partie du groupement prosthétique de carboxylases . Elle joue un rôle dans la respiration des racines et son absence peut entraîner l'arrêt des divisions cellulaires dans le méristème radiculaire (BONNER et GALSTON , 1952) . La pyridoxine , nécessaire au fonctionnement des transaminases intervient dans la synthèse des acides aminés . Enfin , l'acide nicotinique , en tant que précurseur du DPN , joue un rôle dans le fonctionnement des déshydrogénases .

On considère généralement qu'aux températures élevées la vitesse de la photosynthèse diminue plus vite que celle de la respiration . Une partie importante des produits de la photosynthèse seraient alors immédiatement catabolysés (LANGRIDGE et McWILLIAM , 1967) . Néanmoins , les mêmes auteurs signalent que la respiration elle-même est très perturbée aux températures voisines de 35°C . Les membranes mitochondriales seraient endommagées ; le fonctionnement du transport des électrons (cytochromes) serait très affecté ; enfin , les phosphorylations oxydatives pourraient être totalement inhibées . Ainsi , les températures élevées , provoquant une diminution de la respiration terminale et un découplage entre les oxydations et les phosphorylations , il est possible que le DPNH s'accumule dans les cellules entraînant des besoins supplémentaires en DPN oxydé et par conséquent en acide nicotinique . Il est probable que bien d'autres mécanismes peuvent intervenir pour augmenter les besoins en vitamines des racines aux températures élevées . En effet , un grand nombre de protéines enzymatiques se trouvent plus ou moins inhibées à ces températures .

Par ailleurs , il semble que l'absence simultanée du saccharose et des vitamines soit moins défavorable à la croissance des racines que l'absence des seules vitamines . En effet , on n'observe dans ce cas , aucune nécrose des racines . On peut se demander si la présence de saccharose , assurant un métabolisme plus actif ne provoque pas la consommation plus rapide et plus complète des vitamines pré-existant dans la bouture au moment de la mise en culture . Cette observation démontre bien que certains équilibres entre les éléments du milieu nutritif doivent être respectés .

2) Rôle des ions potassium et ammonium .

Les cations monovalents K^+ et NH_4^+ jouent un rôle important dans la croissance et la différenciation de nombreux organes végétaux . Ils favorisent notamment la croissance des méristèmes isolés en culture in vitro (MOREL et MULLER , 1964) . On sait également que le potassium augmente la vitesse de croissance

des tiges chez de nombreuses espèces . Il nous a donc paru important de comparer la croissance des boutures de vigne sur le milieu minéral de KNOP et sur des milieux plus riches en potassium et en ammonium (tableau I) . Ces expériences ont porté sur deux clones de Vitis rupestris , l'un sain , l'autre présentant une forme grave de court-noué .

On constate qu'à chaque phase de développement des boutures (différenciation des racines /et/ ^{croissance des racines} croissance des tiges) correspond un optimum différent de teneur du milieu en ions K et NH_4 . La différenciation des racines se fait dans les meilleures conditions en présence de fortes doses de cations monovalents (environ 15×10^{-3} ions-grammes par litre de potassium et d'ammonium) . L'action favorable des milieux riches en K et NH_4 est particulièrement nette dans le cas des boutures atteintes de court-noué dont la rhizogénèse est faible à 20°C sur le milieu à base de solution de KNOP . Ainsi , dans une expérience où le clone malade ne donnait que 10 p. 100 de boutures capables de s'enraciner sur le milieu de référence , ce même clone s'enracinait dans 40 p. 100 des cas lors du premier bouturage en présence de la solution minérale K - NH_4 - 1000 , et dans 80 p. 100 des cas lors du deuxième bouturage consécutif sur ce milieu . Il semble donc que l'action de ces cations soit de plus en plus nette au fur et à mesure des repiquages successifs . On peut se demander s'il n'existe pas des interactions complexes entre le phénomène de différenciation des racines , la virose et la présence dans les cellules de quantités importantes d'ions K^+ et NH_4^+ . Rappelons à cet égard qu'une action du potassium sur le fonctionnement du matériel génétique a été signalée (KROEGER , 1963) . Cet élément serait responsable , chez certains insectes , d'une activité très intense des gènes conduisant à la mue . La même hypothèse a été reprise pour expliquer des phénomènes particuliers de croissance et de différenciation observés chez les plantules de blé (CHAUSSAT , 1968) . La même propriété des ions K^+ ne pourrait-elle pas expliquer leur action , d'une part , sur la différenciation des racines , d'autre part , sur le développement de la virose , celui-ci pouvant être soumis à une régulation de la part d'inhibiteurs d'origine génétique ?

Les fortes teneurs en potassium et en ammonium ont , au contraire , inhibé la croissance des racines . Les doses les plus favorables à cette croissance sont de l'ordre de 1 à 2×10^{-3} ions-grammes par litre . Enfin , la croissance des tiges se fait dans les meilleures conditions en présence de $7,5 \times 10^{-3}$ ions-grammes par litre de K^+ et NH_4^+ . On peut se demander s'il ne serait pas utile d'adopter un milieu nutritif particulier pour chacun des stades de la culture in vitro des boutures de vigne ? Le milieu KNOP , bien que peu favorable

TABEAU I - Composition de quelques solutions nutritives utilisées pour la culture in vitro de la vigne .

I - Composition du milieu de référence

Solution de KNOP à la dilution I/2	I000 ml
Solution de BERTHELOT	0,5 ml
Saccharose	I5 g
Gélose	8 g
Thiamine (concentration poids/volume)	I0 ⁻⁶
Pyridoxine "	I0 ⁻⁶
Acide nicotinique "	I0 ⁻⁶
Panthoténate de calcium "	I0 ⁻⁶
Inositol "	I0 ⁻⁵
Biotine "	I0 ⁻⁸
pH ajusté à 6,5	

2 - Solution de KNOP modifiée par MOREL (K-NH₄-I000)

Eau	I000 ml
(NO ₃) ₂ · Ca , 4 H ₂ O	500 mg
SO ₄ Mg , 7 H ₂ O	I25 mg
PO ₄ H ₂ K	I25 mg
Cl K	I000 mg
SO ₄ (NH ₄) ₂	I000 mg

Les solutions minérales K-NH₄ 500 , 250 , I25 et 62 ne diffèrent de la solution K-NH₄-I000 que par leur teneur en Cl K et SO₄(NH₄)₂ qui est égale à 500 mg , 250 mg , etc...

3 - Composition des solutions minérales exprimée en millièmes d'ions-grammes/l

	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ⁻⁻	PO ₄ ⁻⁻⁻	K ⁺	NH ₄ ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺
KNOP	0	5,4	0,5	0,9I	2,2	0	2,I	0,5
K-NH ₄ 62	0,84	4,2	0,97	0,9I	I,7	0,94	2,I	0,5
K-NH ₄ I25	I,6	4,2	I,4	0,9I	2,6	I,9	2,I	0,5
K-NH ₄ 250	3,3	4,2	2,4	0,9I	4,2	3,8	2,I	0,5
K-NH ₄ 500	6,7	4,2	4,3	0,9I	7,6	7,5	2,I	0,5
K-NH ₄ I000	I3,4	4,2	8,I	0,9I	I4,3	I5,I	2,I	0,5
KNOP +SO ₄ (NH ₄) ₂ -I000	0	5,4	8,I	0,9I	2,2	I5,I	2,I	0,5
KNOP +SO ₄ (NH ₄) ₂ -500	0	5,4	4,3	0,9I	2,2	7,5	2,I	0,5
KNOP +SO ₄ (NH ₄) ₂ -I25	0	5,4	I,4	0,9I	2,2	I,9	2,I	0,5
KNOP +SO ₄ K ₂ -I000	0	5,4	6,2	0,9I	I3,6	0	2,I	0,5
KNOP +SO ₄ K ₂ -500	0	5,4	3,4	0,9I	7,9	0	2,I	0,5
KNOP +SO ₄ K ₂ -I25	0	5,4	I,2	0,9I	3,6	0	2,I	0,5

à la différenciation des racines , convient pour la culture des clones ayant une bonne rhizogénèse . Mais pour d'autres clones , comme ceux qui sont atteints de court-noué , il pourrait être intéressant de provoquer l'émission des racines en présence d'un milieu comme $K-NH_4-I000$, puis de transférer les plantes , vers le 25ème jour de culture , sur un milieu plus favorable à la croissance (KNOP ou $K-NH_4$ dilué par exemple) . On doit noter que , si la culture sur un milieu riche en potassium et en ammonium permet d'obtenir l'enracinement de boutures court-nouées de Vitis rupestris , il n'en est pas toujours de même lorsque la mauvaise aptitude au bouturage est un caractère lié à la variété .

On doit souligner , enfin , que la composition minérale du milieu nutritif n'a pas une action identique vis-à-vis de la différenciation des racines et de leur croissance . Rappelons que d'autres facteurs ont également des actions différentes à l'égard de ces deux phénomènes (GALZY , 1969) . Ainsi , le virus du court-noué est capable de bloquer la rhizogénèse des boutures de Vitis rupestris cultivées sur une solution de KNOP à 20°C alors qu'il ne réduit pas de façon très sensible la croissance des racines déjà formées .

En résumé , aux différents stades de la culture in vitro de Vitis rupestris correspondent souvent des besoins nutritifs particuliers , tant au point de vue des glucides et des vitamines qu'à celui des sels minéraux.

IV - CULTURE DES BOUTURES TERMINALES ET DES MERISTEMES DE VITIS RUPESTRIS

La mise au point d'une technique permettant la culture de boutures terminales de Vitis rupestris comportant un petit nombre d'ébauches foliaires , présente un intérêt en phytopathologie aussi bien qu'en physiologie végétale .

D'une part , cette technique devrait permettre d'étudier la répartition du virus court-noué au voisinage du sommet végétatif . La culture sur le milieu de référence permet d'obtenir le développement des bourgeons latents de Vitis rupestris prélevés depuis le niveau de la deuxième feuille étalée jusqu'à la base du rameau . Mais , il était nécessaire de rechercher de nouveaux milieux nutritifs de culture qui permettraient d'obtenir la croissance des organes les plus jeunes . Il serait , en effet , nécessaire de pouvoir vérifier si , chez la vigne , comme chez d'autres végétaux , la teneur en virus diminue dans la région terminale du rameau et s'annule au niveau du méristème . S'il en était ainsi , la culture des apex de vigne permettrait d'obtenir des plantes saines à partir de clones virosés , avec un rendement meilleur que la culture de bourgeons isolés . Elle présenterait donc un intérêt agronomique .

D'autre part , les essais systématiques de culture de boutures terminales permettent de comparer les besoins nutritifs d'organes de plus en plus jeunes . C'est pourquoi on a cultivé des boutures terminales comportant une feuille étalée , puis des boutures sans feuille étalée ne comportant que 4 , puis 3 ébauches foliaires . Les méthodes de culture adaptées à chaque cas étaient ainsi mises au point par approches successives . Des besoins différents correspondant à un gradient de différenciation , ont pu être mis en évidence .

La mise au point de ces méthodes de culture a été réalisée à partir de plantes cultivées elles-mêmes in vitro car leurs organes se bouturent plus facilement que les organes homologues prélevés en plein champ . Les difficultés rencontrées pour cultiver des boutures terminales prélevées en plein champ pourraient être liées à leur plus grande richesse en produits phénoliques qui diffusent dans le

milieu et brunissent au contact de l'air . On peut également se demander s'il n'existe pas une différence de teneur en auxine dans la partie subterminale des deux types de plantes , différence liée par exemple aux conditions d'éclairage . En effet , la lumière pourrait être un facteur défavorable à la synthèse de l'auxine (WRIGHT 1968) . Cet auteur admet que les radiations bleues ou rouges stimuleraient la synthèse de l'inhibiteur β (à base d'acide abscissique) qui , lui-même , limiterait la formation de l'auxine . WRIGHT attribue à ces interférences la présence d'une quantité d'auxine plus importante au niveau de l'apex , que dans la partie subterminale de la tige : l'apex recouvert par les jeunes feuilles serait moins éclairé et par conséquent moins riche en inhibiteur β et plus en auxine . On peut se demander si , de la même façon , les plantes cultivées in vitro , peu éclairées par rapport aux plantes cultivées en plein champ , ne pourraient pas être plus riches en auxine , notamment dans la région subterminale de leur tige . Ceci pourrait expliquer le meilleur enracinement des boutures prélevées à ce niveau .

A . COMPARAISON DU DEVELOPPEMENT , SUR LE MILIEU DE REFERENCE , DE BOUTURES COMPORTANT OU NON UNE FEUILLE ETALÉE .

L'aspect du bourgeon terminal de Vitis rupestris est très différent selon que la plante a été cultivée en plein champ ou in vitro . En plein champ , pendant la période de croissance active , les 8 ou 9 premières feuilles sont très imbriquées les unes sur les autres . La première feuille étalée se trouve au rang 9 ou 10 . Chez les plantes obtenues in vitro , dans nos conditions de culture , seules les quatre premières feuilles sont repliées sur l'apex , la feuille de rang 5 étant étalée . Les boutures de Vitis rupestris comportant une feuille étalée et prélevées sur une plante cultivée in vitro se développent de la même façon sur le milieu de référence , qu'elles proviennent de la partie terminale de la tige ou d'un autre niveau . Les valeurs moyennes caractéristiques du développement de ces boutures à 20° sont les suivantes :

- Pourcentage de boutures enracinées = 97
- Vitesse d'émission des racines = 8,4
- Vitesse maximale de croissance des racines en mm/j = 3,1
- Vitesse maximale de croissance des tiges en mm/j = 1,6
- Début de la croissance linéaire des tiges 20 j.

Ces résultats sont satisfaisants et reproductibles . Les boutures terminales ne comportant pas de feuille étalée (boutures à 4 ébauches foliaires) présentent un développement moins bon et plus irrégulier sur le milieu de référence :

- Pourcentage de boutures enracinées 25 à 70 moyenne 33
- Vitesse d'émission des racines 1,4 à 6,5 moyenne 3,6
- Vitesse maximale de croissance des racines en mm/j 0,3 à 1,5 moyenne 1,1
- Vitesse maximale des croissances des tiges en mm/j 0,1 à 1,5 moyenne 0,8
- Début de la croissance linéaire des tiges 40 à 50 jours .

Les résultats obtenus sur le même milieu nutritif avec les boutures à 3 ébauches sont encore un peu inférieurs :

- Pourcentage de boutures enracinées 5 à 40 moyenne 23
- Vitesse d'émission des racines 0,4 à 2 moyenne 1,1
- Vitesse maximale de croissance des racines en mm/j 0,7 à 1,7 moyenne 1,1
- Vitesse maximale de croissance des tiges en mm/j 0,1 à 1,5 moyenne 0,6
- Début de la croissance linéaire des tiges : 50 à 70 jours .

La suppression de la feuille étalée est défavorable à la différenciation des racines et réduit la vitesse de croissance de la bouture pendant une longue période. La suppression de la 4ème ébauche provoque une réduction supplémentaire du nombre de boutures capables de s'enraciner , et de la vitesse d'émission des racines. Elle prolonge également la durée de la période précédant la croissance rapide des tiges . Par contre , les vitesses de croissance des tiges et des racines ne sont pas modifiées . Pour les boutures à 3 et 4 ébauches , il était nécessaire de rechercher un milieu de culture capable de stimuler la différenciation des racines et le début de la croissance des tiges .

B) CULTURE DE BOUTURES TERMINALES COMPORTANT 3 OU 4 EBAUCHES FOLIAIRES .

Chez les plantes cultivées in vitro , la 4ème feuille est insérée à 1,5 ou 2 mm du sommet végétatif . Les boutures à 4 ébauches foliaires présentent donc une longueur d'axe de 3 à 4 mm au moment de la mise en culture . La 3ème ébauche est insérée à 0,5 ou 0,8 mm du sommet végétatif et les boutures à 3 ébauches foliaires correspondent à une longueur d'axe d'environ 1 mm .

Dans un premier temps on a cherché à analyser l'action de plusieurs éléments du milieu nutritif sur la croissance des boutures . (ANA , Gibbérelline , kinétine , éléments minéraux) . Des doses variables de l'élément étudié étaient incorporées aux milieux de culture . La croissance des boutures était suivie pendant 100 jours environ sans qu'il soit procédé à aucun changement de milieu .

Dans un second temps on a cherché à mettre au point des milieux particulièrement adaptés à chacune des phases de croissance des boutures .

1) Culture prolongée en présence d'un même milieu nutritif .

a - Influence de l'acide naphthalène acétique . (figure 4) .

En présence de la solution minérale de KNOP , l'acide naphthalène acétique , utilisé à des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-7} , favorise la rhizogénèse des boutures à 3 et 4 ébauches foliaires . Il est par contre défavorable à la croissance des racines (dès la concentration 10^{-8}) et à celle des tiges (à partir de 5×10^{-8}) .

En associant l'acide naphthalène acétique à la solution minérale $K-NH_4-I000$ on obtient également des milieux très favorables à la différenciation des racines . Mais ces milieux ne permettent pas une croissance normale des boutures . Il semble que la toxicité des ions K^+ et NH_4^+ , utilisés à forte dose , se trouve renforcée par l'adjonction d'ANA . En effet , une dose d'ANA aussi faible que 10^{-8} g/ml , non toxique en présence de KNOP , provoque , en présence de $K-NH_4-I000$ un développement très anormal des boutures . Il se forme un grand nombre de racines qui ne peuvent pas se développer à l'intérieur du milieu de culture mais qui se ramifient abondamment au dessus de la gélose . La tige est grêle et les feuilles étroites et enroulées . On sait que l'acide naphthalène acétique favorise l'entrée de l'eau et des substances dissoutes à l'intérieur des cellules (HACKETT et THIMANN , 1952) . Cette propriété pourrait expliquer les effets apparemment additifs de l'ANA et du milieu $K-NH_4-I000$ riche en certains éléments minéraux .

b - Influence de la gibbérelline . (figure 5)

La gibbérelline inhibe la formation des racines chez Vitis rupestris comme chez beaucoup d'autres espèces végétales . (STOWE et YAMAKI , 1957) . L'effet inhibiteur augmente régulièrement avec la dose de gibbérelline . Pourtant , la solution minérale $K-NH_4-I000$, plus favorable à la rhizogénèse , permet d'obtenir la formation des racines en présence de doses faibles de gibbérelline .

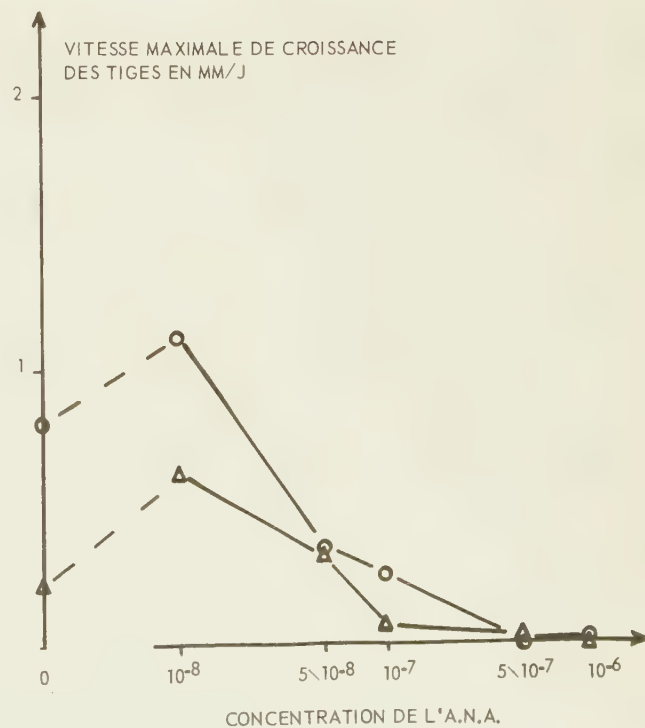
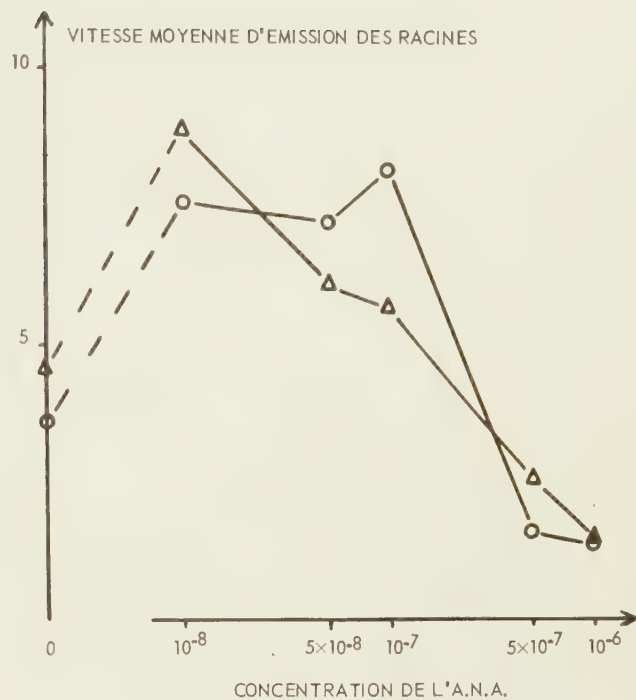
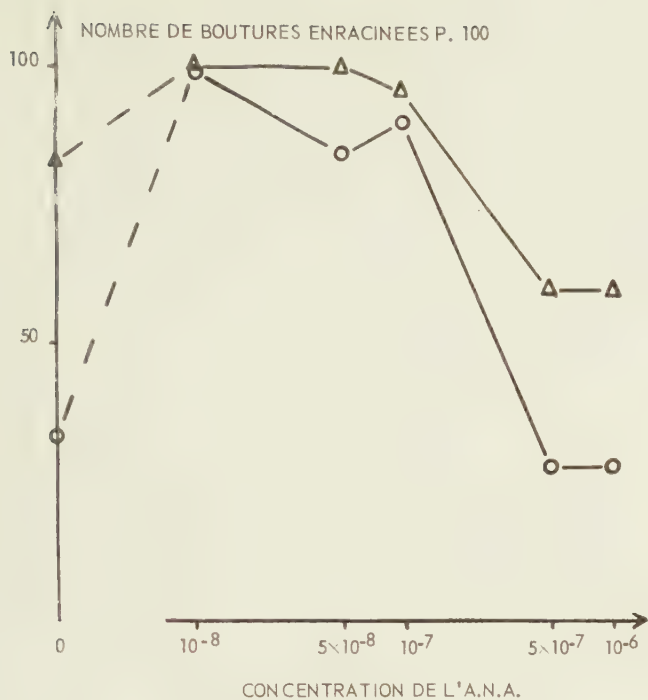


Fig. 4 - Développement de boutures terminales de *Vitis rupestris* comportant 4 ébauches foliaires en présence de différentes doses d'ANA. L'expérience a été réalisée avec deux solutions minérales différentes : O Solution de KNOP. Δ Solution K - NH₄ - 1000.

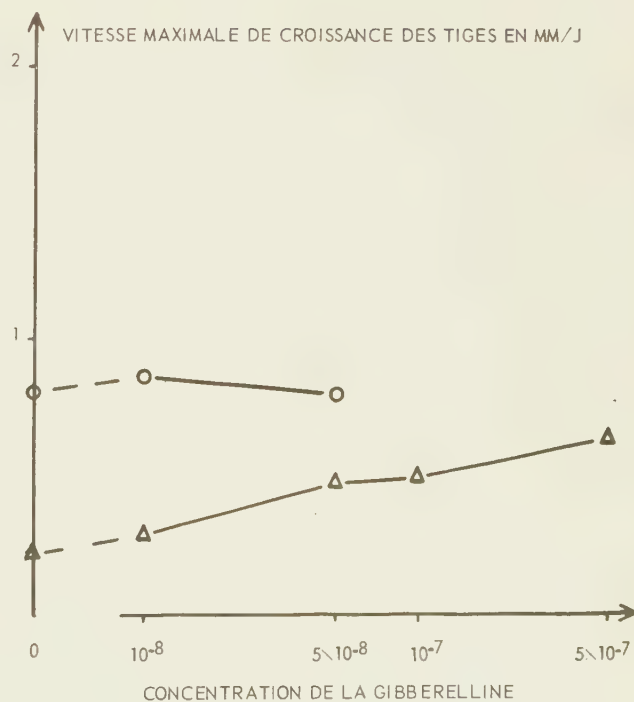
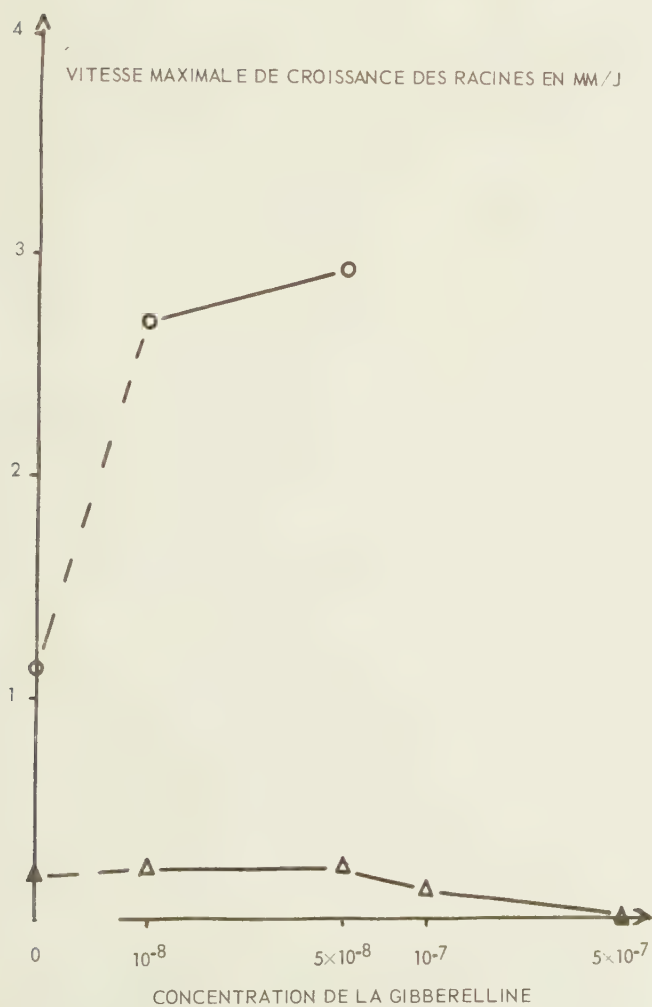
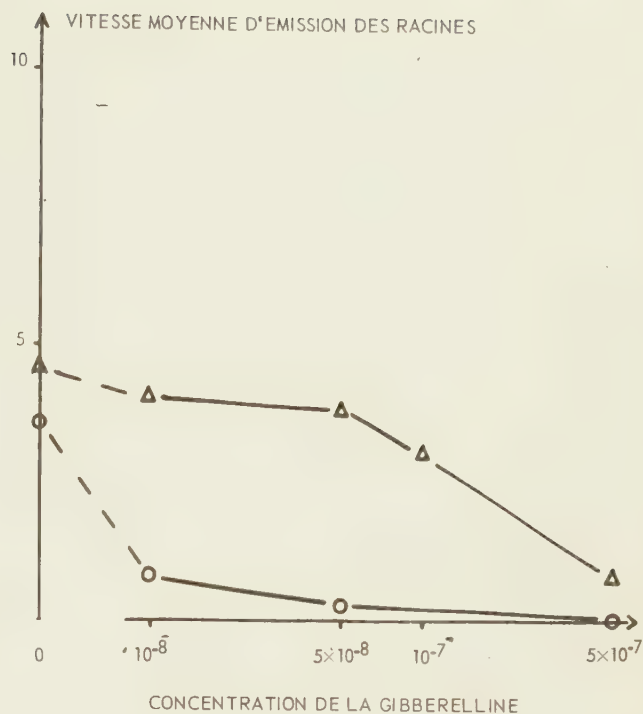
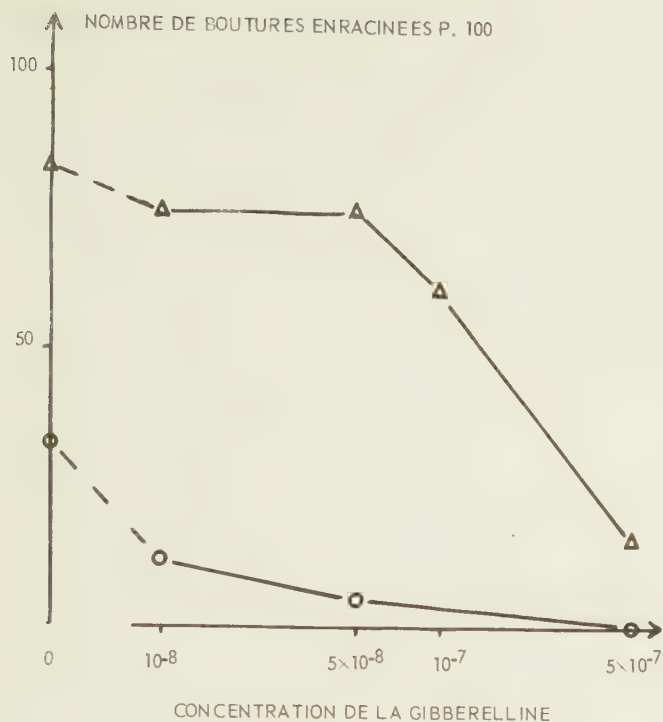


Fig. 5 - Développement de boutures terminales de *Vitis rupestris* comportant 4 ébauches foliaires en présence de différentes doses de gibbéréline. O Milieu minéral de KNOP. Δ Milieu minéral K - NH₄ - 1000.

On observe , par contre , sous l'effet de la gibbérelline , une nette réduction de la période de latence qui précède la croissance linéaire des tiges . Sur le milieu de référence à base de solution de KNOP cette période dure 40 jours au moins . Elle a été ramenée à 20 jours en ajoutant de la gibbérelline . En présence de la solution $K-NH_4-I000$, ce délai n'est que de 28 jours et il peut être réduit à 5 jours grâce à la gibbérelline . La réaction de la plante à un apport de gibbérelline semble donc différer selon la solution minérale présente dans le milieu de culture . Plusieurs auteurs ont déjà signalé l'action de la gibbérelline et celle des ions K^+ et NH_4^+ sur le fonctionnement du méristème apical . (MOREL 1964 , CHAUSSAT 1968) . Mais remarquons que , dans le cas des boutures terminales de Vitis rupestris , si les effets de la gibbérelline et de la solution riche en K^+ et NH_4^+ semblent bien s'ajouter vis-à-vis du méristème apical, ils sont , par contre , opposés vis-à-vis de la différenciation des racines .

Dans les conditions de culture utilisées ici , l'action favorable de la gibbérelline sur la croissance des tiges ne se prolonge pas au delà de quelques jours . Pour obtenir une augmentation de la vitesse maximale de croissance il est nécessaire d'appliquer la gibbérelline après l'émission des racines . Dans ce cas , la gibbérelline utilisée à la concentration 5×10^{-8} peut permettre d'obtenir une croissance maximale deux fois plus rapide que celle du témoin .

c - Influence de la kinétine .

La kinétine incorporée au milieu de référence s'est montrée défavorable à la différenciation des racines chez les boutures terminales à 4 ébauches foliaires . Par contre , elle n'a pas modifié du tout la vitesse maximale de croissance des racines . La croissance des tiges , inchangée en présence des faibles concentrations de kinétine , a été très réduite en présence des fortes concentrations (5×10^{-7} et 10^{-6}) . Enfin , le début de la croissance linéaire des tiges s'est trouvé retardé , quelle que soit la dose utilisée . En résumé , les essais de culture en présence de kinétine n'ont pas permis de mettre en évidence un effet favorable de cette substance sur la croissance des boutures terminales , du moins, lorsqu'elle est apportée dès la mise en culture .

d - Influence des ions K^+ et NH_4^+ .

On sait que des doses importantes de cations monovalents K^+ et NH_4^+ sont nécessaires à la croissance des méristèmes de pomme de terre isolés en culture in vitro (MOREL , 1964) . D'autre part , on a pu constater que , chez les boutures de Vitis rupestris comportant une feuille étalée , les doses de potassium et d'am-

monium favorables à la différenciation des racines et celles qui permettent une croissance normale des plantes , sont très différentes . Une expérimentation était donc nécessaire pour déterminer les teneurs en cations les plus favorables à l'enracinement et à la croissance dans le cas de boutures terminales à 3 et 4 ébauches foliaires . Enfin , il a paru souhaitable de distinguer , dans la mesure du possible , le rôle propre joué par chacun des deux ions K^+ et NH_4^+ dans le développement de ces boutures .

Dans un premier temps , nous avons donc comparé le développement des boutures comportant 3 ébauches , 4 ébauches ou une feuille étalée sur des milieux de culture plus ou moins riches en potassium et en ammonium . Il s'agissait des milieux de type $K-NH_4$ contenant de 62 à 1000 mg de $Cl\ K$ et de $SO_4(NH_4)_2$. (figure 6) .

On constate que des doses de plus en plus fortes de potassium et d'ammonium sont nécessaires pour obtenir la formation des racines sur les organes les plus jeunes . Dans le cas des boutures à 3 ébauches , le meilleur résultat est obtenu avec 1g / litre de sulfate d'ammonium et de chlorure de potassium . Au contraire , pour les boutures comportant des organes plus différenciés , la concentration optimale des deux sels est comprise entre 125 et 500 mg / litre . Soulignons que , d'une façon générale , les vitesses d'émission des racines diminuent régulièrement lorsque les organes mis en culture sont moins différenciés . Afin de préciser ce décalage dans l'émission des racines , on a déterminé graphiquement le temps moyen d'émission des racines . (C'est à dire le temps nécessaire pour que la moitié des boutures capables de s'enraciner aient émis une racine) . Dans le cas du milieu $K-NH_4$ -500 , on trouve les valeurs suivantes : boutures à une feuille étalée , 9 jours - boutures à 4 ébauches , 12 jours - boutures à 3 ébauches , 22 jours . Il n'est pas impossible que ces différences résultent , en partie , de la nécessité pour les organes les plus jeunes , de subir certaines transformations , dans les jours qui suivent la mise en culture , avant que la différenciation des racines soit possible .

La croissance des racines a toujours été maximale en présence des doses les plus faibles de sulfate d'ammonium et de chlorure de potassium (62 ou 125 mg / litre) . Pour la croissance des tiges , au contraire , les teneurs optimales semblent diminuer quand les organes mis en culture sont plus jeunes : 500 mg / litre pour les boutures portant une feuille étalée ; 125 ou 250 mg/l

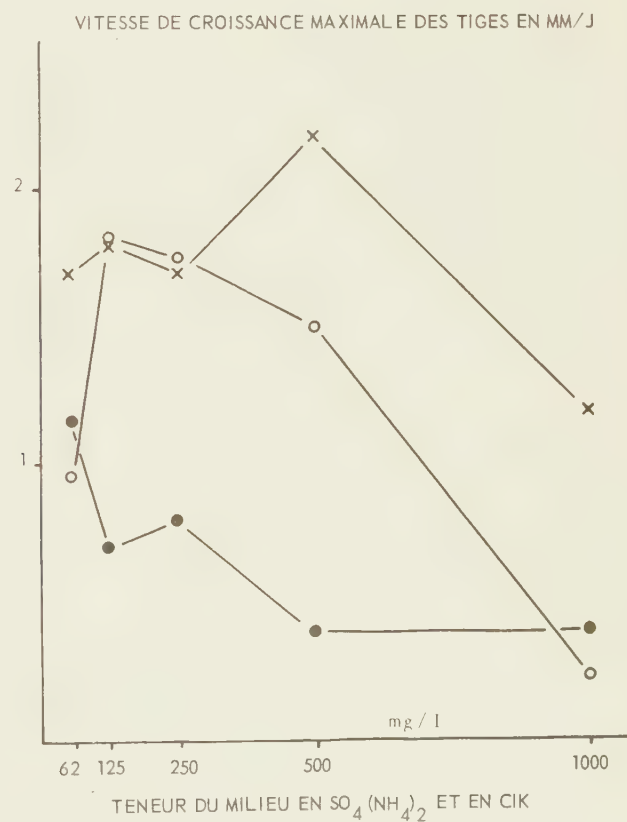
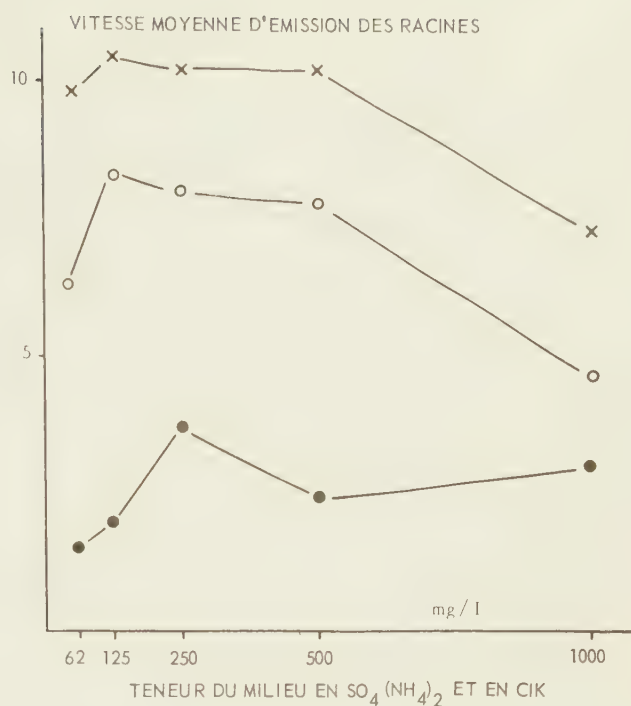
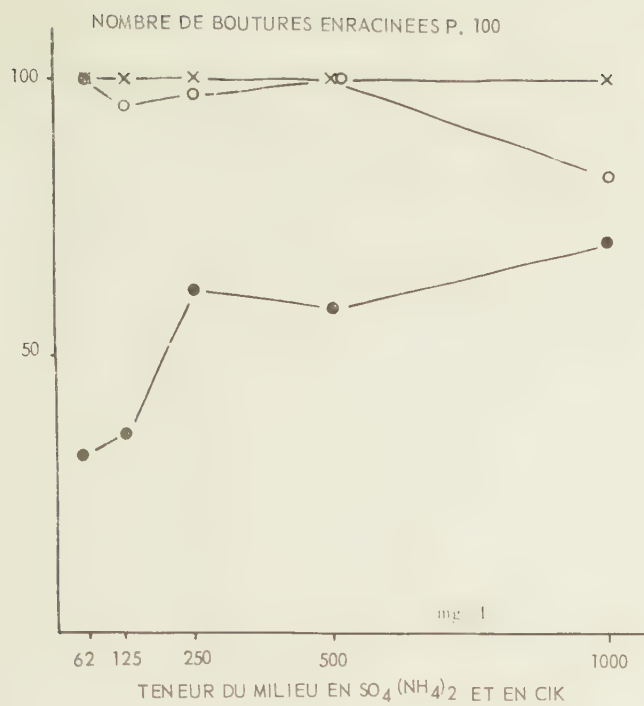


Fig. 6 - Comparaison du développement, sur des milieux minéraux de type K - NH_4 plus ou moins riches en potassium et en ammonium, de différents types de boutures :

- x Boutures comportant une feuille étalée
- o Boutures comportant 4 ébauches foliaires
- Boutures comportant 3 ébauches foliaires

pour les boutures à 4 ébauches foliaires , 62 mg/l pour les boutures à 3 ébauches . On remarque qu'en présence de 62 mg/l de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et de Cl K la croissance des boutures à 3 et à 4 ébauches est identique . Lorsque le milieu contient 125 ou 250 mg/l de ces deux sels , les boutures à 4 ébauches poussent comme les boutures portant une feuille étalée , c'est à dire que , dans ces conditions de nutrition , l'absence de feuille étalée ne semble pas modifier la croissance des boutures terminales . Enfin , sur les milieux K- NH_4 -500 et 1000 la croissance des boutures à une feuille étalée est meilleure que celle des boutures à 4 ébauches . On peut se demander si la présence d'une feuille bien développée n'est pas susceptible de régulariser l'afflux des éléments minéraux vers l'apex . Chez les boutures à 4 ébauches foliaires et surtout à 3 ébauches , le sommet végétatif paraît exposé plus directement à un excès d'éléments minéraux . De plus , la dose toxique de potassium pourrait être atteinte très vite dans le cas des boutures à 3 ébauches . On admet , en effet , que les tissus les plus jeunes sont les plus riches en potassium et en ammonium (MOREL , 1964) . Il faut néanmoins souligner que les milieux riches en potassium et en ammonium provoquent chez les boutures terminales de vigne une réduction du temps de latence précédant la croissance linéaire des tiges .

En résumé , des doses de K^+ et NH_4^+ de plus en plus fortes sont nécessaires pour obtenir la différenciation de racines chez des organes de plus en plus jeunes . Par contre , la croissance des boutures nécessite des milieux de plus en plus dilués . Cette observation paraît , à première vue , contradictoire avec celles de MOREL qui utilise des teneurs élevées en K^+ et NH_4^+ pour obtenir la croissance des méristèmes de pomme de terre . Cette différence s'explique probablement par la présence précoce de racines sur les explantats de vigne .

Par la suite nous avons cherché à comparer le rôle des ions K^+ et celui des ions NH_4^+ dans le développement des boutures terminales de Vitis rupestris . Des boutures terminales à 4 ébauches ont été cultivées sur des milieux complets comportant les solutions minérales suivantes : KNOP seul , KNOP + $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ aux doses 125 , 500 et 1000 mg/l et KNOP + SO_4K_2 aux doses 125 , 500 et 1000 mg/l. (figure 7) . Les deux ions K^+ et NH_4^+ se sont montrés favorables à l'émission des racines , mais l'ion NH_4^+ paraît être actif dans une gamme de concentrations un peu plus large . Fournis à faible dose , ils augmentent la vitesse de croissance des racines . Aux fortes doses , l'ammonium paraît plus toxique pour les racines que le potassium . Enfin , vis-à-vis de la croissance des tiges les deux

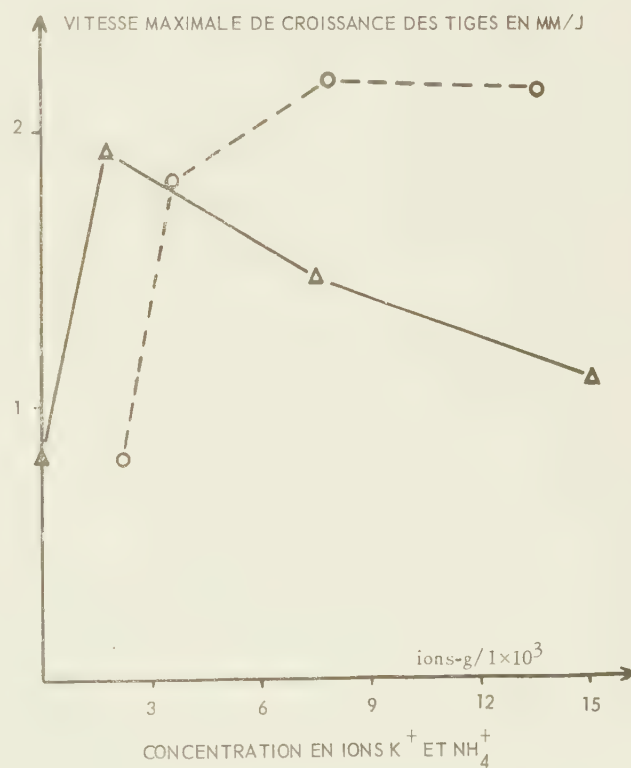
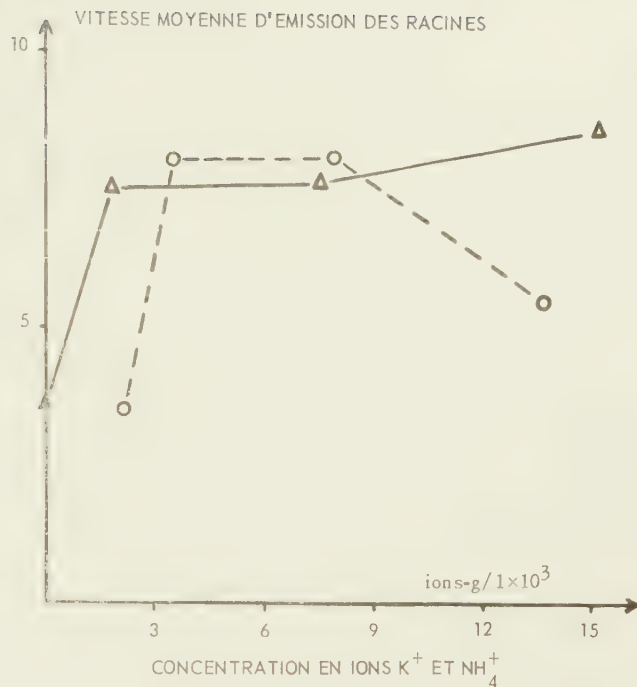
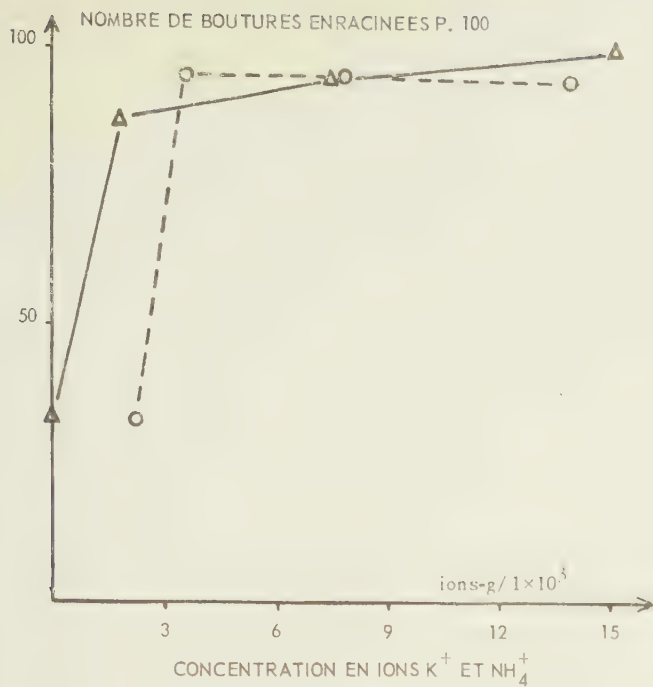


Fig. 7 - Action comparée des ions K⁺ et NH₄⁺ sur le développement de lots de boutures terminales à 4 ébauches foliaires. Le milieu minéral de base était la solution de KNOP à laquelle on a ajouté soit du sulfate de potassium, soit du sulfate d'ammonium. La teneur du milieu en K⁺ et NH₄⁺ est exprimée en millièmes d'ion gramme par litre.

O KNOP + SO₄ K₂ (0 - 125 - 500 - 1000 mg/l)

△ KNOP + SO₄ (NH₄)₂ (0 - 125 - 500 - 1000 mg/l)

ions ont un effet très différent . L'ammonium n'est favorable qu'à la dose la plus faible . Le potassium , au contraire , a toujours augmenté la vitesse de croissance des tiges . Il a été bien toléré , même à concentration la plus élevée ($13,4 \times 10^{-3}$ ion-gramme par litre) . De plus , les plantes cultivées sur les milieux riches en potassium ont présenté des feuilles plus larges et plus vertes . Enfin , les deux ions permettent d'obtenir un début plus précoce de la croissance linéaire des tiges . Cette expérience semble bien indiquer une action spécifique de l'ion K^+ sur la vitesse de croissance des tiges de Vitis rupestris alors que l'ion NH_4^+ agirait plus nettement sur la différenciation des racines . Pour tenter de confirmer ces observations nous avons recherché les corrélations pouvant exister entre les vitesses de développement (enracinement , croissance etc...) et la composition minérale des milieux . La vitesse maximale de croissance des racines , la vitesse maximale de croissance des tiges et la vitesse moyenne d'émission des racines , paraissent être liées à la teneur totale du milieu en ions K^+ et NH_4^+ . Dans ces calculs on a distingué les cas où les ions K^+ et NH_4^+ étaient associés , et les cas où le potassium était le seul cation monovalent présent dans le milieu . (figure 8) . Il semble bien que l'ion K^+ seul , d'une part , et les ions K^+ et NH_4^+ ensemble , d'autre part , aient une action identique sur la croissance des racines . Dans les deux cas , la teneur totale optimale en cations monovalents est de l'ordre de 5 millièmes d'ion-gramme par litre . Au contraire , lorsqu'il s'agit de la croissance des tiges , l'ion K^+ seul est plus favorable que des doses équivalentes d'ions K^+ et NH_4^+ associés . Enfin , pour l'émission des racines , on observe une situation inverse : l'ensemble $K^+ + NH_4^+$ paraissant plus favorable que K^+ seul . Mais dans ce cas , les résultats sont un peu moins nets .

De la même façon , des relations ont été recherchées entre les vitesses de développement et les autres constituants du milieu minéral qui ont varié dans nos expériences . Aucune autre corrélation n'a pu être mise en évidence .

e - Conclusion .

Il a été possible d'obtenir , sur un même milieu nutritif , l'enracinement et la croissance de boutures terminales comportant 3 ou 4 ébauches foliaires . Ce résultat est obtenu en enrichissant le milieu minéral de KNOP en ions K et NH_4 ou en incorporant de l'acide naphthalène acétique au milieu de référence . On remarque cependant qu'aucun des milieux utilisés n'a permis d'obtenir à la fois l'enracinement rapide des boutures et une croissance maximale des tiges et des racines . Ainsi les milieux très riches en potassium ont été les plus favorables

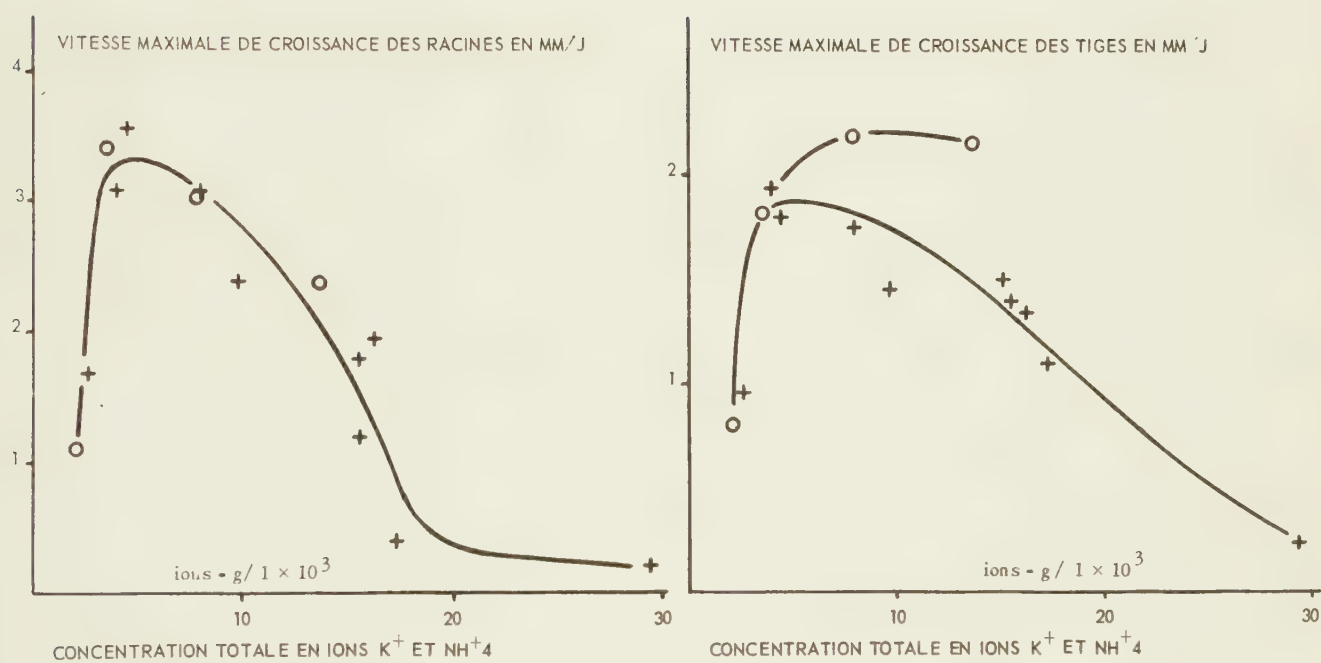


Fig. 8 - Essai de comparaison de la croissance de boutures terminales comportant 4 ébauches foliaires sur des milieux contenant :

- soit K^+ comme seul cation monovalent 0
- soit K^+ et NH_4 ensemble +

à la croissance des tiges alors qu'ils ne permettaient qu'une croissance moyenne des racines . D'autre part , les milieux les plus capables d'induire la différenciation des racines se sont montrés très toxiques à longue échéance et incapables d'assurer une croissance normale des plantes . (milieux à base d'ANA ou très riches en ammonium) . On constate donc , de nouveau , qu'aux différentes phases du développement in vitro des boutures de Vitis rupestris peuvent correspondre des besoins nutritifs très différents . On pourrait , par conséquent , envisager de fournir aux boutures au moins deux milieux successifs : l'un provoquant la formation des racines et l'autre permettant la croissance rapide des boutures enracinées .

2) Culture successive sur deux milieux nutritifs différents .

Cette technique a été expérimentée sur des boutures terminales à 3 ébauches foliaires . Celles-ci ont été placées , d'abord sur des milieux nutritifs susceptibles d'induire la rhizogénèse . Après 25 à 30 jours la moitié d'entr'elles ont été transférées sur un milieu favorable à la croissance . Ce second milieu était , dans tous les cas , le milieu de référence (figure 9) . L'expérimentation a donc porté essentiellement sur la mise au point d'un milieu favorable à la différenciation des racines . L'ANA a été associé , soit au milieu de référence à base de solution de KNOP , soit à un milieu contenant la solution $K-NH_4-I000$. On obtient , dans ce deuxième cas , des milieux très favorables à la rhizogénèse et dont l'effet toxique est totalement évité à condition de limiter leur temps d'action à 30 jours (figure 10) . Ce passage de quelques semaines sur un milieu contenant de l'ANA a un effet favorable sur la croissance ultérieure des tiges . La culture sur des milieux complets contenant les solutions minérales $K-NH_4$ 250 , 500 ou I000 , suivie d'un transfert , après 25 jours , sur le milieu de référence, a également donné de bons résultats (figure 11) . La croissance a été comparable à celle des boutures portant une feuille étalée et cultivées sur le milieu de référence . Le pourcentage de boutures enracinées était compris entre 80 et 90 , la vitesse de croissance des racines était de l'ordre de 3 mm/jour et l'allongement des tiges atteignait 2 mm/jour . Cependant , certaines phases du développement de ces boutures sont restées lentes : la vitesse d'émission des racines n'a pas dépassé la valeur 5 alors qu'elle est comprise entre 8 et 9 dans le cas de boutures à une feuille étalée . De même , la croissance rapide des tiges n'a débuté qu'après 35 ou 40 jours au lieu de 20 . On peut penser que , chez les boutures à 3 ébauches , une certaine évolution des organes mis en culture doit

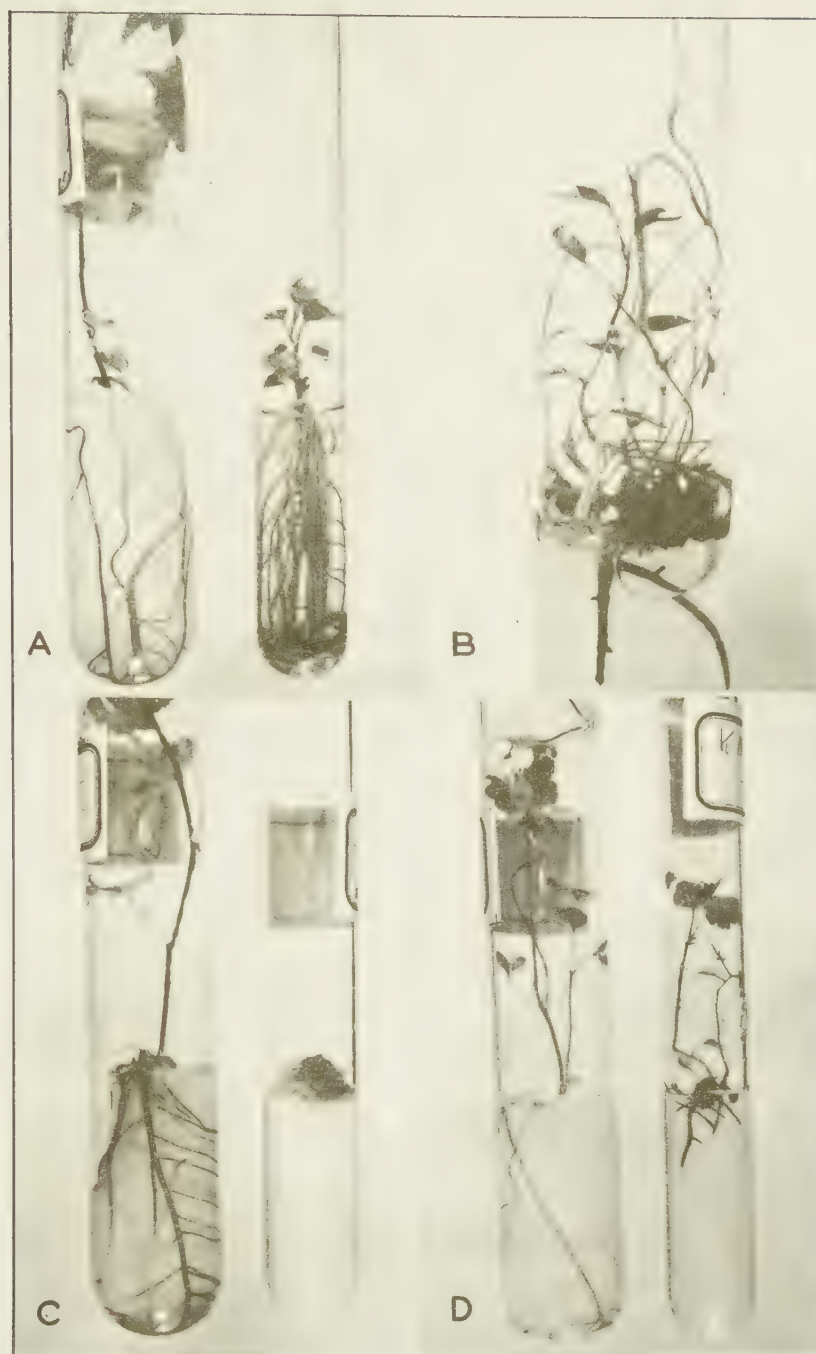


Fig. 9 - Développement de boutures terminales, comportant 3 ébauches foliaires et cultivées sur différents milieux nutritifs.

A - A droite, plante cultivée depuis 90 jours sur un milieu contenant la solution minérale de KNOP et de l'ANA à la concentration 5×10^{-8} . A gauche, culture identique transférée, après 25 jours, sur le milieu de référence, sans ANA.

B - Plante cultivée depuis 200 jours sur un milieu contenant la solution K - NH_4 - 1000 et de l'ANA à la concentration 10^{-8} .

C - A droite, bouture envahie par un cal après 110 jours sur un milieu contenant la solution K - NH_4 - 1000 et de l'ANA à la concentration 10^{-7} . A gauche, culture de la même série transférée, après 25 jours, sur le milieu de référence, sans ANA.

D - A droite, plante cultivée depuis 130 jours sur un milieu contenant les éléments minéraux de la solution K - NH_4 - 1000. A gauche, plante de la même série transférée après 26 jours sur le milieu de référence à base de solution de KNOP.

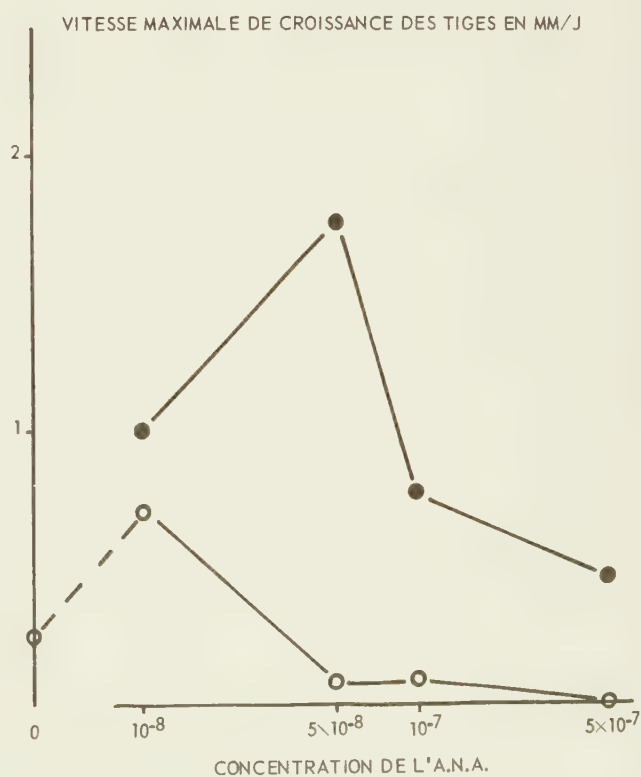
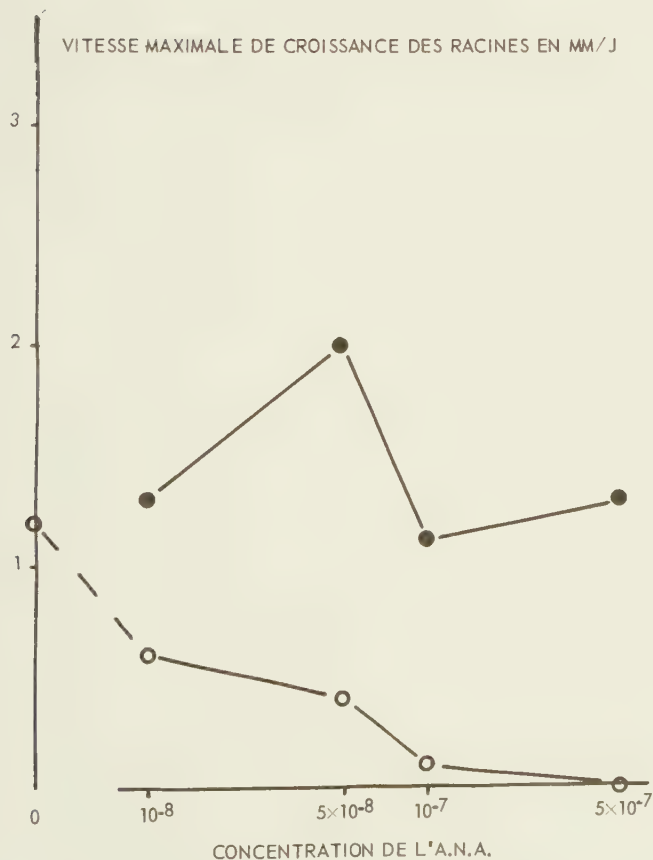
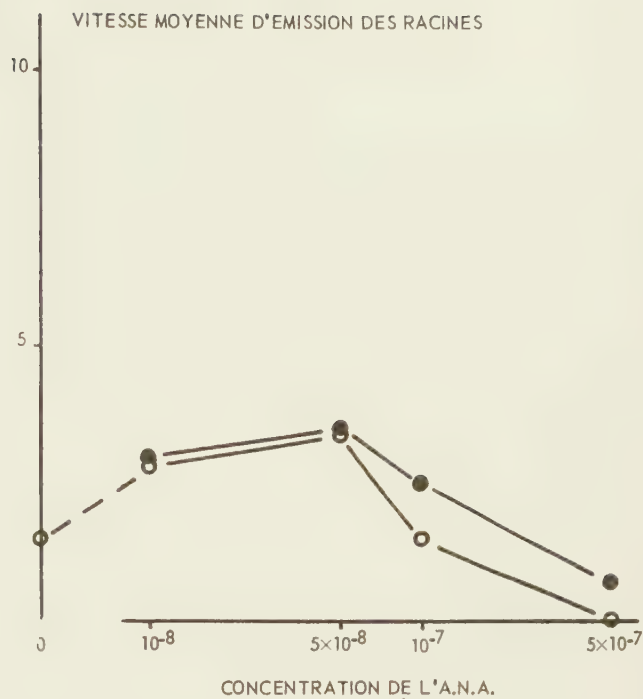
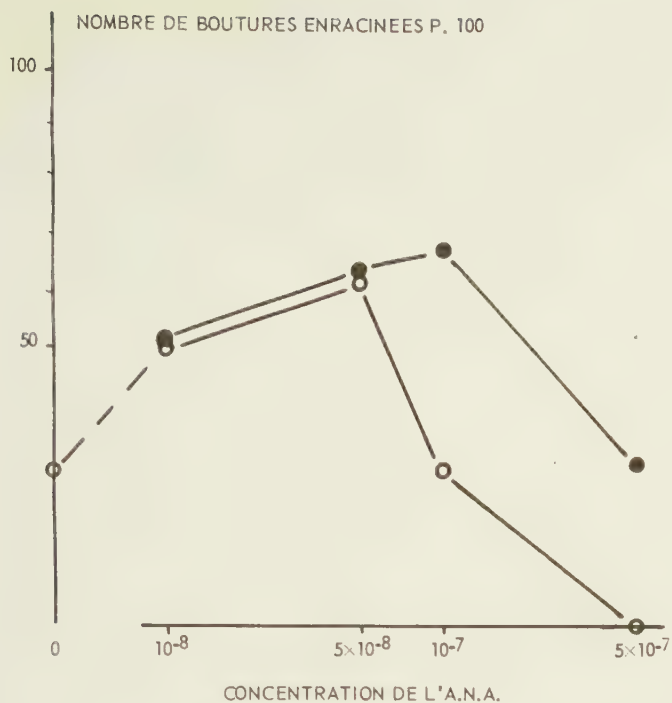


Fig. 10 - Développement de boutures terminales comportant 3 ébauches foliaires sur le milieu de référence additionné de différentes doses d'ANA. Les plantes ont été :

- soit conservées sur le milieu d'origine : O
- soit transférées après 30 jours sur le milieu de référence sans ANA : ●

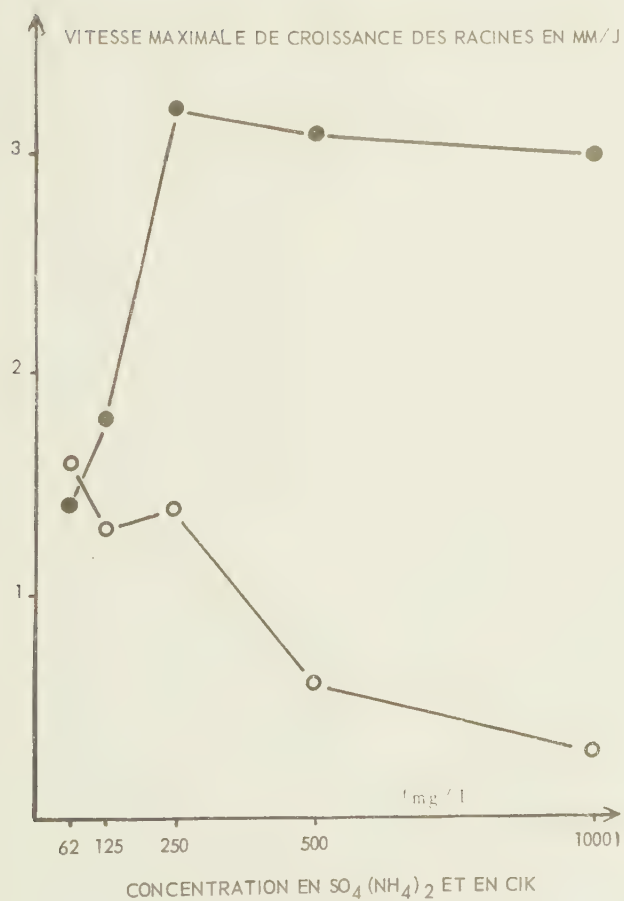
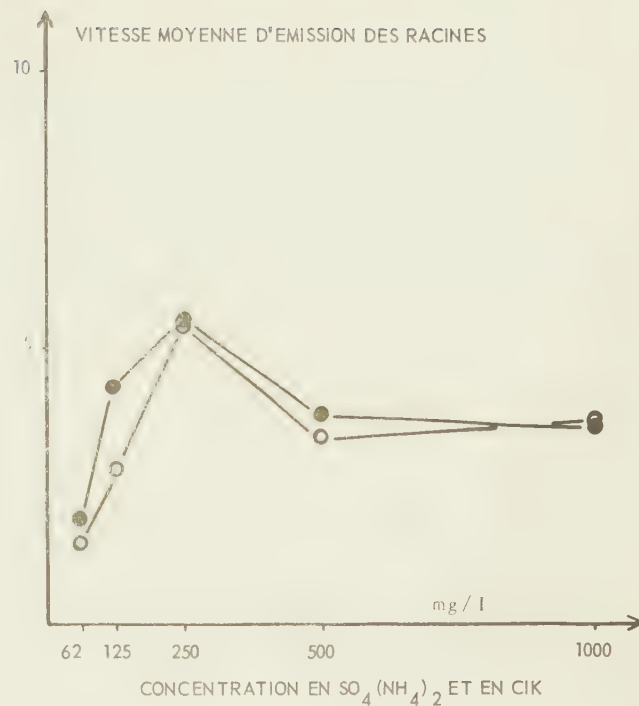
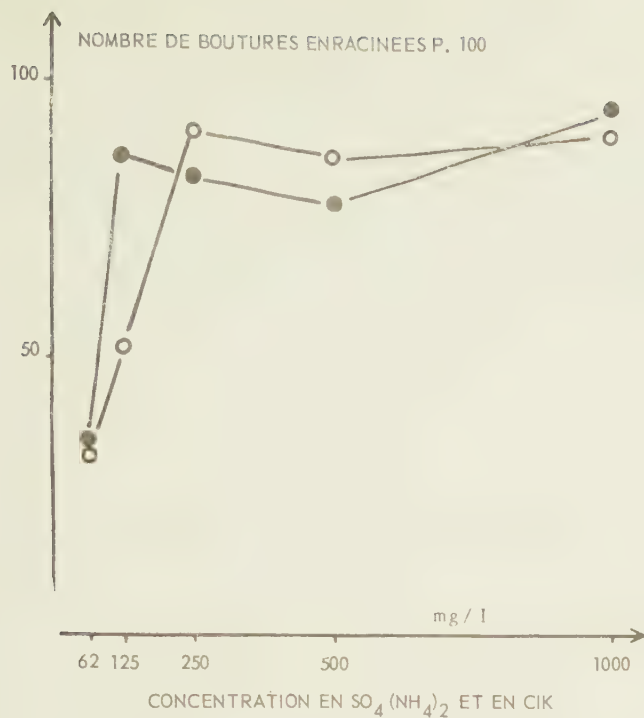


Fig. 11 - Développement de boutures terminales comportant 3 ébauches foliaires sur des milieux minéraux de type K - NH_4 plus ou moins riches en sulfate d'ammonium et en chlorure de potassium. Les plantes ont été :

- soit conservées sur le milieu d'origine : O
- soit transférées sur le milieu de référence après 25 jours : ●

se produire avant que la formation des racines ne soit possible . Les conditions de culture adoptées ici n'ont pas permis de supprimer complètement cette phase de latence . Néanmoins , l'absence de la 4ème et de la 5ème feuille a pu être en grande partie compensée en plaçant les cultures pendant les premières semaines sur des milieux nutritifs capables de stimuler à la fois la rhizogénèse et le fonctionnement du méristème .

C) CULTURE DE BOUTURES TERMINALES COMPORTANT DEUX EBAUCHES FOLIAIRES

La culture des apex comportant deux ébauches foliaires et mesurant 200 μ environ présente de grandes difficultés . Pour obtenir leur développement il a été nécessaire de les cultiver successivement , comme les boutures à 3 ébauches sur plusieurs milieux nutritifs .

La différenciation des racines n'a été obtenue qu'en présence d'ANA . En effet , en l'absence d'ANA la survie des méristèmes est pratiquement nulle , quel que soit le milieu minéral utilisé (KNOP ou $K-NH_4-I000$) . L'addition d'ANA au milieu de référence a permis d'obtenir l'enracinement d'une partie des explantats : 12 p. 100 à la concentration 10^{-8} , 31 p. 100 à la concentration 5×10^{-8} et 40 p. 100 à la concentration 10^{-7} . La vitesse d'émission des racines est cependant très faible (0,4 , environ) . L'utilisation de la solution $K-NH_4-I000$ n'a pas permis d'améliorer , dans ce cas , la rhizogénèse . Les résultats obtenus ont , au contraire , été inférieurs aux précédents : 29 p. 100 d'explantats enracinés en présence d'ANA à la concentration 10^{-7} .

Cette observation peut paraître en contradiction avec les résultats obtenus pour les boutures à 3 et 4 ébauches foliaires chez lesquelles les ions K^+ et NH_4^+ d'une part et l'ANA d'autre part , présentaient une action conjuguée favorable à la rhizogénèse . Cependant il faut rappeler que les ions K^+ et NH_4^+ paraissent être de plus en plus toxiques au fur et à mesure que les organes étudiés sont plus proches de l'apex . Or , les pourcentages indiqués ici tiennent compte , non seulement des possibilités de rhizogénèse , mais également de la proportion d'apex capable de survivre en culture in vitro . Cette proportion est probablement plus faible en présence de la solution $K-NH_4$.

Pour obtenir la croissance des explantats enracinés il est nécessaire de les transférer sur le milieu de référence . La date de ce transfert conditionne la réussite de la culture . Il doit se faire de façon d'autant plus précoce que la teneur en ANA du premier milieu est plus élevée . En effet , les plantes maintenues trop longtemps en présence d'ANA présentent par la suite une croissance de la tige anormalement lente (figure I3) . Le temps de séjour optimum sur le premier milieu paraît être de l'ordre de 80 jours lorsque la concentration de l'ANA est de 5×10^{-8} , 30 jours pour 10^{-7} et de 15 à 20 jours pour 5×10^{-7} . La figure I2 représente les courbes de croissance obtenues pour un lot de méristèmes placé dans des conditions favorables . On remarque cependant que les vitesses de croissance restent faibles (0,3 mm/jour pour les tiges) . Des expériences en cours suggèrent qu'il pourrait être utile , après avoir obtenu la formation des racines , de placer pendant quelques semaines , les explantats sur un milieu très favorable à la croissance des tiges (milieu à base de gibbérelline par exemple) . Cette méthode consiste , en quelque sorte , à induire successivement les différenciations utiles par des transferts sur des milieux de culture différents .

Les sommets végétatifs à 2 ébauches foliaires ont les dimensions habituelles (200 μ) des méristèmes cultivés en vue de l'obtention de plantes indemmes de virus . Des sommets ont donc été prélevés aussi sur des plantes court-nouées cultivées in vitro . La proportion de méristèmes enracinés a été un peu plus faible que pour des explantats provenant d'un clone sain . Les plantes obtenues ne présentaient , au début , aucun symptôme de court-noué . Elles ont pu être multipliées par bouturage et leur rhizogénèse était normale . Mais , après 8 mois de culture in vitro , ces plantes ont présenté des déformations foliaires caractéristiques du court-noué . Le nombre de méristèmes prélevés sur des plantes malades est cependant encore trop faible pour que l'on puisse affirmer qu'il est impossible d'obtenir , par cette méthode , des plantes totalement indemmes de virus .

D) CONCLUSION .

Au cours de ce travail , des milieux nutritifs et des méthodes de culture ont été mis au point dans le but d'obtenir le développement in vitro de boutures terminales de Vitis rupestris . On a pu ainsi cultiver avec succès des boutures

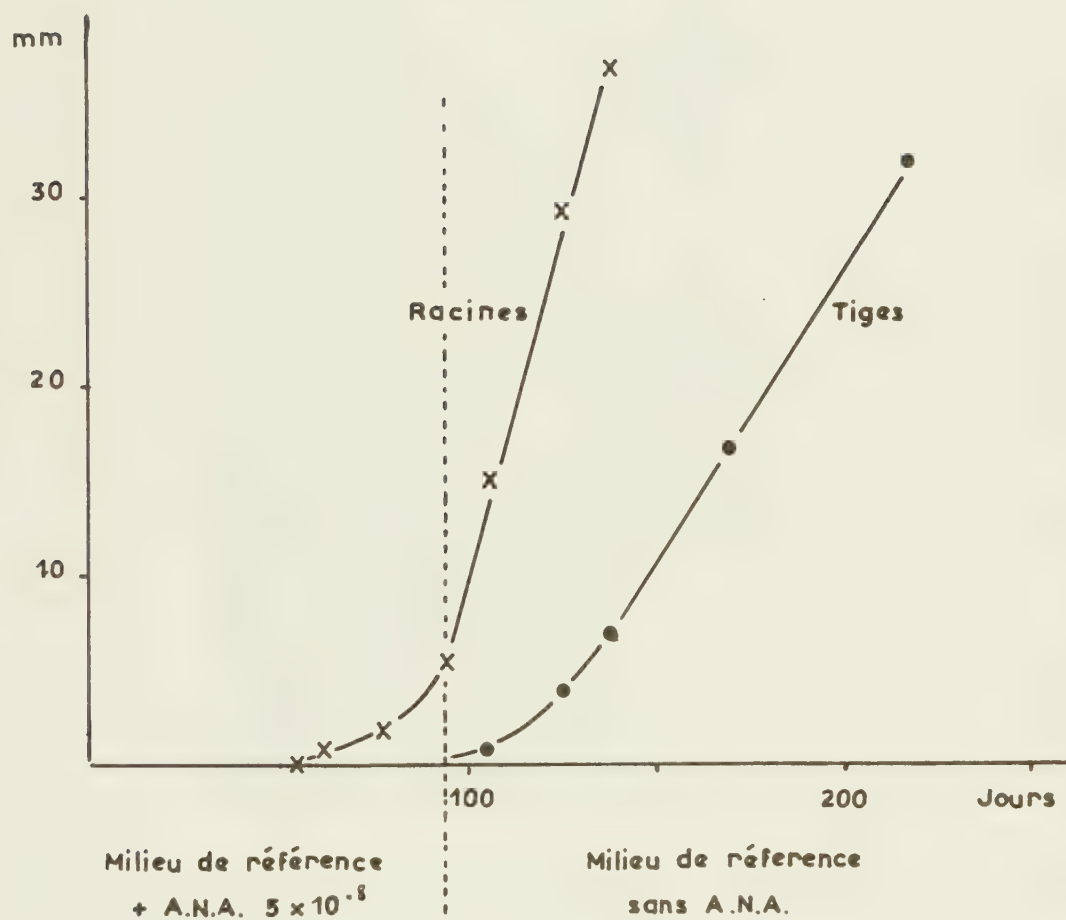


Fig. 12 - Courbes de croissance des racines et des tiges obtenues pour des méristèmes à deux ébauches foliaires cultivés pendant 94 jours sur le milieu de référence additionné d'A.N.A. à la concentration 5×10^{-8} , puis transférés sur un milieu sans A.N.A. -

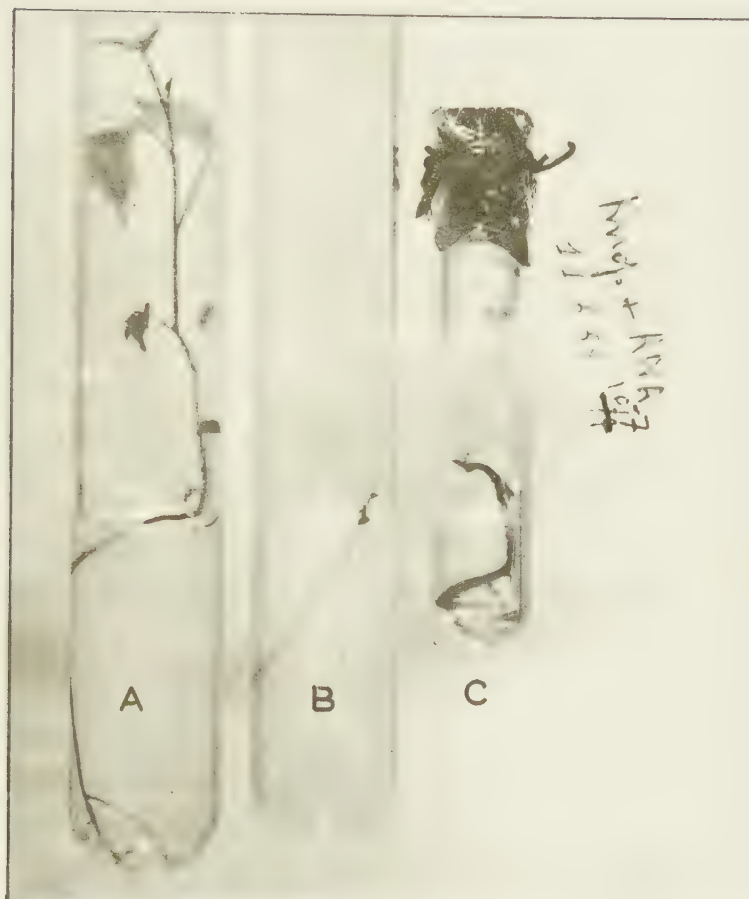


Fig. 13 - Plantes obtenues après 4 mois de culture *in vitro*, à partir de méristèmes à deux ébauches foliaires. La première culture a été faite en présence d'ANA à la concentration 10^{-7} .

A - Plante transférée sur le milieu de référence après 30 jours.

B - Plante transférée après 100 jours.

C - Plante non transférée.

ne comportant que 2 ébauches foliaires et mesurant 100 à 200 μ environ . Pour parvenir à ce résultat , il a été nécessaire d'étudier les besoins nutritifs de boutures composées d'organes de plus en plus jeunes . Il a été possible de définir , pour chaque cas étudié , des conditions de culture permettant d'obtenir d'abord la différenciation des racines et ensuite la croissance des tiges et des racines . On doit souligner que les divers facteurs étudiés agissent le plus souvent de façon spécifique sur l'une ou l'autre des phases de développement des boutures . Certains facteurs induisent la rhizogénèse et d'autres favorisent la croissance des tiges et des racines . Mais on a constaté que la culture des boutures terminales présente des difficultés de plus en plus grandes au fur et à mesure que les organes mis en culture sont moins différenciés . En effet , les milieux capables d'induire la différenciation des racines deviennent alors très différents de ceux permettant la croissance . Ainsi , les organes les plus jeunes ne s'enracinent qu'en présence de doses de plus en plus importantes d'ions K^+ et NH_4^+ alors que ces mêmes organes ne supportent pas un contact prolongé avec les milieux riches en cations monovalents . De même , la présence d'ANA dans le milieu de culture assure la néoformation des racines mais ne permet pas la croissance des boutures . Ces observations nous ont amené à utiliser successivement plusieurs milieux nutritifs . Ces passages sur des milieux différents ont pour but d'induire successivement plusieurs types de différenciation au niveau d'un même explantat .

La principale difficulté de cette méthode réside dans le fait que l'action d'un milieu peut modifier l'état physiologique de l'ensemble des tissus dans un sens qui pourrait être défavorable aux étapes suivantes . Ce risque est naturellement d'autant plus grand que la fraction d'axe prélevée est plus petite . Il est donc nécessaire de bien doser l'action de l'élément inducteur présent dans un milieu , de façon à éviter un effet remanent indésirable .

ETUDE DE CERTAINS ASPECTS DES RELATIONS HOTE-VIRUS CHEZ DES CLONES DE VIGNE

Cette étude a présenté deux aspects principaux . Dans un premier temps , on a cherché à préciser la répartition du virus à l'intérieur de souches de vigne cultivées à MONTPELLIER , dans les conditions naturelles . Les résultats de ce travail suggèrent que la présence de zones sans virus pourrait être influencée par les conditions climatiques . Il était donc nécessaire , dans un deuxième temps , d'étudier de façon précise l'action des températures élevées sur la virose . Ce travail a été réalisé dans les conditions de la culture in vitro .

1 . REPARTITION DU VIRUS A L'INTERIEUR D'UNE PLANTE CULTIVEE EN PLEIN CHAMP

Il était généralement admis autrefois que toutes les plantes obtenues par multiplication végétative à partir d'une souche de vigne court-nouée présentaient un état pathologique identique à celui de la plante mère . Le virus

aurait donc été uniformément réparti dans tous les organes de l'hôte . Cette idée était fondée sur l'observation de clones obtenus par la technique viticole habituelle où les bois sont prélevés en hiver et les parties terminales des rameaux éliminées . En prélevant , au contraire , des organes pendant toute l'année sur l'ensemble du rameau et en les cultivant in vitro , nous avons pu faire des observations nouvelles sur la répartition du virus . Les bourgeons ont été prélevés sur des souches de vigne virosées et mis en culture individuellement sur le milieu de référence à 20°C en tenant compte de leur rang sur le rameau et de leur souche d'origine .

Ce matériel a été étudié d'abord en culture in vitro . On a suivi le développement , non seulement des bourgeons eux-mêmes , mais de leur descendance . On a particulièrement noté les symptômes de court-noué et la rhizogénèse des boutures . Le virus du court-noué provoque en effet une réduction importante de la rhizogénèse in vitro à 20°C . Le tableau 2 et la figure I4 permettent de comparer , à titre d'exemple les caractères de 4 clones de Vitis rupestris maintenus en culture in vitro à 20°C :

- le clone I S 58 cultivé au domaine de Vassal , sélectionné pour son état sanitaire satisfaisant , a été considéré au départ comme témoin sain . Il est désigné par la lettre S .

- le clone I Condamine provient d'une souche de Montpellier atteinte d'une forme grave de court-noué . Il est désigné par la lettre M .

Les deux clones S et M après avoir été mis en culture in vitro ont été soumis à des traitements thermiques divers . On doit donc distinguer actuellement , au lieu des clones originaux , des sous-clones dont l'état sanitaire peut être différent selon la température et la durée du traitement thermique qu'ils ont subi . Ainsi , S 20 provient de plantes S constamment cultivées in vitro à 20°C et S 35 a été obtenu à partir de plantes S cultivées pendant 100 jours à 35°C avant d'être ramenées à 20°C . De la même façon , on a obtenu à partir du clone M des plantes qui peuvent être désignées par M 20 et M 35 . On peut penser que l'état sanitaire des clones S 20 et M 20 cultivés in vitro à 20°C n'est pas différent de celui des clones I S 58 et I Condamine dont ils proviennent respectivement . Le traitement de 100 jours à 35°C n'a pas modifié de façon appréciable le comportement du clone S en culture in vitro . Par contre , le même traitement appliqué au clone M a provoqué la disparition irréversible des symptômes de court-noué . Cultivé à 20°C sur le milieu de base le clone M 20 se distingue

CLONES	I CONDAMINE		I.S.58 VASSAL	
	Non traité (M.20)	Traité thermo- thérapie (M.35)	Non traité S.20	Traité thermo- thérapie S.35
Nombre de boutures enracinées p. 100 , après 30 jours	9,1	96,0	94,1	93,9
Vitesse moyenne d'émission des racines	0,6	9,1	9,3	8,4
Vitesse maximale moyenne de croissance des racines (mm/j)	2,2	3,2	3,2	3,2
Vitesse maximale moyenne de croissance des tiges (mm/j)	0,7	1,8	1,6	1,6
Début de la croissance liné- aire des tiges (en jours)	40 à 50 ^e	20 - 25 ^e	20 - 25 ^e	20 - 25 ^e
R (dent médiane)	2,26	1,68	1,66	1,66
r (dents latérales)	1,52	0,70	0,78	0,74

TABLERAU 2 - Principaux caractères physiologiques et morphologiques permettant de distinguer le clone M.20 des clones sains cultivés in vitro à 20°C sur le milieu de référence .

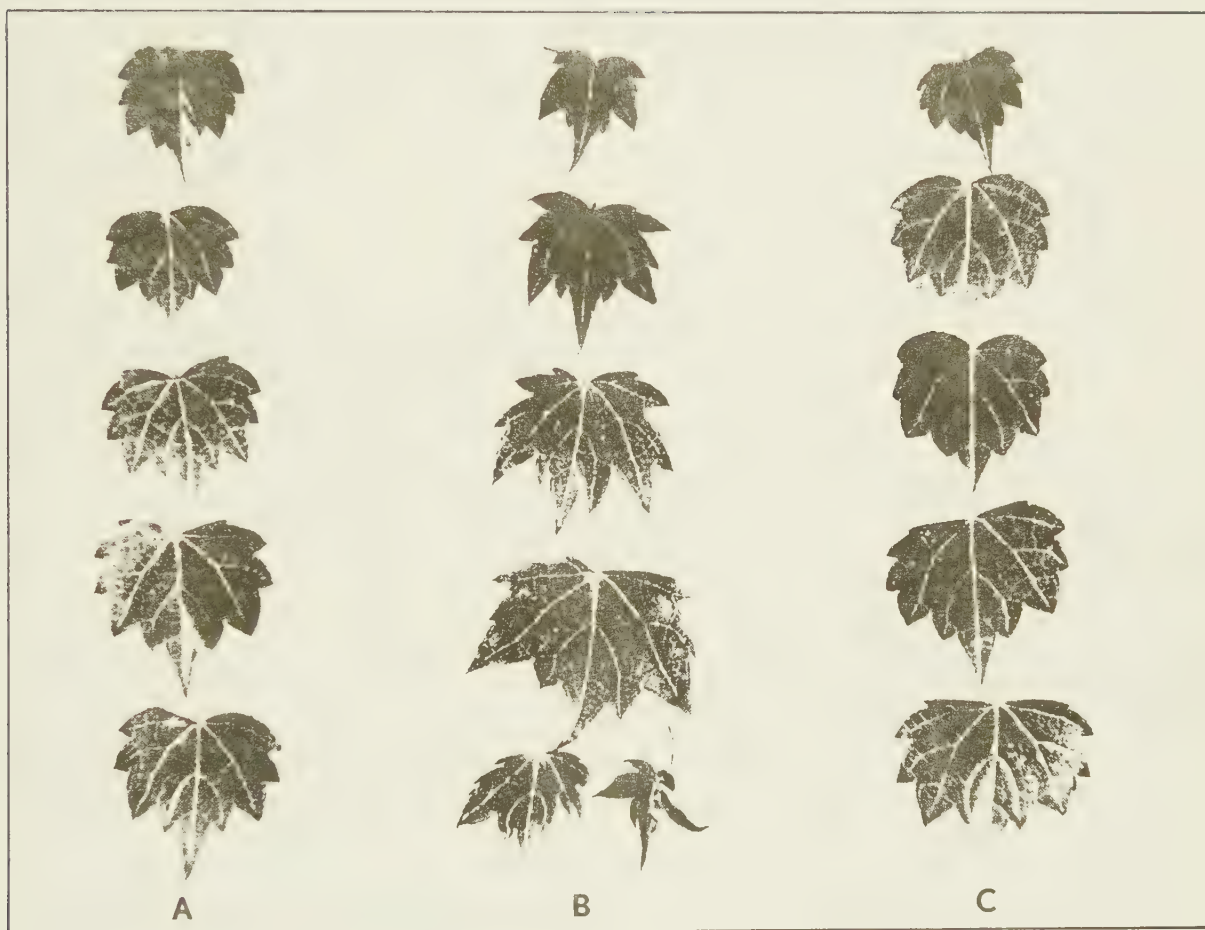


Fig. 14 - Feuilles prélevées sur des plantes de *Vitis rupestris*
cultivées *in vitro* à 20°

A - clone S 20 ; B - clone M 20 ; C - clone M 35 ;

nettement des clones réputés sains par la forme des feuilles , par la rhizogénèse au bouturage et par sa croissance .

L'allongement des dents de la feuille , déformation typique des plantes court-nouées , peut être caractérisé par le rapport de la longueur de la dent à sa largeur à la base . Cette valeur a été calculée pour la dent terminant la nervure médiane (rapport R) et pour celles terminant les deux premières nervures latérales (rapport r). Le tableau 2 indique les valeurs de R et r caractéristiques des 4 clones . Ces exemples montrent qu'il est possible de reconnaître , au cours de la multiplication végétative in vitro , les bourgeons virosés et les bourgeons sains .

A) CAS DE VITIS RUPESTRIS ATTEINT DE COURT-NOUE .

Les observations ont porté sur plusieurs cas de court-noué .

1) Prélèvements effectués à la vigne de la Condamine en 1961 et 1962.

Ces prélèvements ont porté sur des souches de Vitis rupestris gravement court-nouées (figure I5) . Taillées en tête de saule , elles portent un grand nombre de rameaux grêles , à croissance lente . La plupart d'entre eux présentent des anomalies telles que double-noeuds ou fasciations . Les feuilles ont une forme en palmette et une mosaïque intense . Les déformations foliaires et le retard de la croissance sont particulièrement remarquables au début de la végétation. Cependant , tous les symptômes continuent à apparaître avec une grande netteté jusqu'à la fin de la croissance , sur toute la longueur du rameau . L'augmentation de la vitesse de croissance obtenue pour quelques souches par ombrage , arrosage et apport d'engrais , n'a pas modifié la généralisation et l'homogénéité des symptômes le long du rameau .

La plupart des bourgeons prélevés sur ces souches se sont développés en donnant une tige qui présentait les symptômes du court-noué . Cependant , quelques-uns ont , au contraire , donné des plantes apparemment saines . Sur plus de 1100 bourgeons développés in vitro , 1,4 p. 100 ont ainsi paru être indemnes de court-noué . Les plantes formées in vitro à partir de ces bourgeons se sont distinguées par leur croissance rapide , par la forme régulière de leurs feuilles et par



Fig. 15 - Echantillons prélevés sur des plantes saines et court-nouées de *Vitis rupestris* var. du Lot.

A - Feuille provenant d'une plante saine.

B - Mosaïque.

C - Déformations foliaires observées surtout à la base des rameaux.

D - Fasciation sur un rameau.

E - Cordon endovasculaire dans un faisceau ligneux.

une rhizogénèse normale . De tels "bourgeons sans symptômes" n'ont été rencontrés qu'à la fin de la période de croissance active , alors que les rameaux portaient au moins une trentaine de feuilles . Il s'agissait de bourgeons latents situés sur la partie herbacée des rameaux , à l'aisselle de l'une des huit dernière feuilles étalées .

Les plantes issues de bourgeons sains ont été transférées à la culture en serre puis en plein champ . Elles ont conservé un très bon état sanitaire . Une partie d'entre elles a pu être contaminée expérimentalement par greffage .

2) Prélèvements effectués à la vigne de la Condamine en 1966 .

Ces prélèvements ont été effectués sur des souches de Vitis rupestris présentant la même forme de court-noué mais ayant subi une taille différente . Au cours des deux années précédentes , on avait laissé à la base de ces souches des rameaux longs . En juillet 1966 l'aspect de la végétation était très différent de celui des souches voisines . Des bourgeons prélevés sur ces souches ont été mis en culture le 1er juillet 1966 . On peut distinguer trois cas selon la position des rameaux sur la souche (figure I6) .

a) Les rameaux formés au centre de la souche , sur la partie taillée en tête de saule étaient grêles et présentaient des symptômes très graves de court-noué . Les bourgeons prélevés sur ces rameaux se sont développés en donnant des plantes qui présentaient toutes des symptômes de court-noué .

b) Les rameaux formés à la base du bois de 2 ans (c'est à dire à partir des bourgeons de rangs I à 6) étaient un peu plus vigoureux que les précédents mais leurs feuilles présentaient néanmoins des déformations et la mosaïque , caractéristiques du court-noué . Les bourgeons prélevés sur ces rameaux n'ont donné naissance qu'à des plantes malades .

c) Les rameaux formés à l'extrémité du bois de deux ans (à partir des bourgeons de rangs 7 et 8) présentaient un grand développement . Les entrenœuds étaient longs et les feuilles du sommet ne présentaient pas de déformations . Les bourgeons prélevés sur le rameau n°8 et sur les prompt-bourgeons qu'il portait se sont développés in vitro en donnant , soit des plantes nettement court-nouées , soit des plantes saines . Les plantes saines provenaient surtout des parties terminales du rameau et des prompt-bourgeons .

Ces observations semblent indiquer que le mode de conduite pourrait avoir une influence sur la répartition du virus à l'intérieur de la souche de vigne .



Fig. 16 - Trois rameaux provenant d'une même souche de *Vitis rupestris* et prélevés à la « Condamine » en 1966.

- A - Rameau provenant du centre de la souche et présentant des symptômes très graves de court-noué.
- B - Rameau formé à la base du bois de deux ans et présentant des symptômes plus atténués.
- C - Rameau vigoureux formé à l'extrémité du bois de deux ans et portant des feuilles d'aspect à peu près normal.

L'allongement de la charpente paraît en effet s'accompagner ici d'une dilution du virus dans les rameaux les plus éloignés du tronc .

3) Prélèvements effectués au Domaine de Lavalette en 1961

Les souches étudiées à Lavalette sont beaucoup moins gravement court-nouées que celles de la Condamine . Elles sont taillées en tête de saule . Leur croissance est assez bonne . Cependant , au début de la végétation , la plupart des feuilles présentent une mosaïque nette et les plus basses sont déformées (dents longues , sinus pétioleaire anormalement ouvert) . On peut également relever un petit nombre d'anomalies sur les rameaux . Mais , vers le 1er Juin et alors que les rameaux ont atteint le stade 10 feuilles environ , les nouvelles feuilles formées commencent à être plus régulières , plus larges et indemnes de mosaïque . L'aspect des souches s'améliore ainsi au cours de l'été . Ces observations suggèrent que l'on a affaire ici à une souche de virus dont la migration à l'intérieur des rameaux est lente . Des bourgeons ont été prélevés le 30 Juin alors que les rameaux étaient au stade 22 feuilles environ . . On a pu trouver parmi ceux-ci un grand nombre de bourgeons ne présentant pas les symptômes du court-noué . Leur fréquence était particulièrement élevée (75 p. 100) dans la moitié supérieure du rameau (rangs II à 20) . On retrouve donc à Lavalette et à la Condamine un comportement analogue des boutures à un oeil cultivées in vitro à 20°C . Certaines ont une descendance végétative incapable de s'enraciner et elles sont rapidement éliminées ; d'autres ont une descendance apparemment saine et elles sont en quelque sorte sélectionnées dans nos conditions de culture . Cependant , la proportion des bourgeons dont la descendance présente une rhizogénèse normale en culture in vitro et se maintient apparemment saine en culture normale paraît être très différente chez Vitis rupestris selon le cas de court-noué étudié et selon le mode de conduite adoptée .

B) CAS DU CEPAGE UGNI BLANC ATTEINT DE LACINIURE .

Des cultures de bourgeons isolés ont également été effectuées dans le cas d'un cépage de Vitis vinifera présentant des caractéristiques intéressantes . Il s'agit d'un clone d'Ugni blanc à feuilles laciniées trouvé en Charente . Les

plantes présentent des feuilles extrêmement découpées et très caractéristiques . Cependant la laciniure n'est pas générale . Il peut arriver qu'un rameau porte , à partir d'un certain niveau , des feuilles ayant les caractères de l'Ugni blanc normal . Ce phénomène est particulièrement net lorsque la plante est vigoureuse et se développe à une température élevée . Ainsi , une plante cultivée en serre en 1967 a donné un rameau de 3,60 m. portant 58 feuilles dont les 20 premières seulement étaient laciniées . D'autre part , les plantes laciniées que nous avons pu observer présentaient généralement des symptômes identiques à ceux du court-noué (double noeud , fasciations , millerandage) . Le 28 Juin 1963 des bourgeons latents prélevés sur une souche normale d'Ugni blanc et sur une souche laciniée ont été mis en culture in vitro . Un seul des bourgeons provenant de la plante laciniée s'est développé en donnant une tige à feuilles découpées . Il s'agissait d'un bourgeon prélevé à la base d'une tige (rang 9) . On doit noter que plusieurs cultures ont été perdues , dans cette expérience , par suite de contaminations . Il est certain néanmoins , qu'au moment de la mise en culture le caractère lacinié n'était pas présent chez tous les bourgeons latents bien que les rameaux n'aient porté , à ce moment là , que des feuilles découpées . Chaque culture de bourgeon multipliée végétativement in vitro à 20°C a donné naissance à un clone . L'ensemble de la descendance végétative du bourgeon n°9 a présenté le caractère lacinié alors que les autres clones ne l'ont jamais présenté . Le clone lacinié se distinguait également des autres par une rhizogénèse très faible à 20°C sur milieu . Chacun des clones isolé en culture in vitro a conservé ses caractères propres , aussi bien au cours de la multiplication in vitro que lors de la culture ultérieure en serre et en plein champ .

En conclusion , le caractère lacinié de l'Ugni blanc se comporte à certains égards , comme une virose puisque sa répartition à l'intérieur de la plante est hétérogène dans certaines circonstances et que son élimination par un traitement thermique peut être obtenue (voir chapitre suivant) .

C) CONCLUSION .

La culture in vitro de bourgeons isolés a permis , dans plusieurs cas , la mise en évidence de zones indemnes de virus chez des souches de vigne virosées . La répartition irrégulière du virus à l'intérieur de la plante n'est

pas en contradiction avec les données de la virologie . On sait en effet depuis longtemps que certains virus ne sont pas capables d'envahir toutes les cellules de leur hôte . Une étude détaillée des mouvements du virus de la mosaïque du Tabac chez la tomate (KUNKEL , 1939) a montré que ce virus pouvait traverser certaines zones de la tige sans s'y fixer . Des cas analogues ont été rencontrés par la suite chez des plantes annuelles aussi bien que chez des arbres fruitiers . La répartition irrégulière du virus a même été mise à profit dans la pratique , pour obtenir , par bouturage , des clones sains à partir de variétés virosées (HOLMES , 1955) . En réalité , la guérison est souvent obtenue en bouturant des extrémités de tiges en cours de croissance rapide . Il est connu en effet que la teneur en virus est d'autant plus faible que l'on se rapproche davantage des sommets végétatifs (LIMASSE et CORNUET , 1950) . Dans les cas décrits ici , "les bourgeons sans symptôme " se sont trouvés le plus souvent vers le sommet des rameaux . Leur isolement et leur multiplication en culture in vitro ont permis de créer des clones apparemment sains à partir de souches virosées . Cette méthode de guérison des clones de vigne peut présenter , dans certains cas , un intérêt pratique . Cependant , la culture de méristèmes devrait permettre d'obtenir un pourcentage plus élevé de plantes guéries .

On doit souligner , par ailleurs , que la présence sur une même souche de bourgeons malades et de "bourgeons sans symptôme " pourrait être de nature à compliquer les travaux de sélection clonale s'il s'avérait que la répartition irrégulière du virus peut conduire à des clones hétérogènes du point de vue sanitaire . Il est évident que les techniques viticoles de multiplication végétative sont moins favorables que la culture in vitro à la séparation des parties saines et des parties malades . Cependant , la grande fréquence des "bourgeons sans symptôme" sur certaines souches faiblement court-nouées constitue un élément favorable à l'apparition d'une descendance hétérogène . Dans ces conditions , la présence d'une souche malade dans un clone considéré comme satisfaisant au point de vue sanitaire , ne serait pas forcément le résultat d'une contamination accidentelle . Cela pourrait indiquer au contraire que tout le clone est suspect et doit être rejeté . Cette façon de voir a d'ailleurs été exprimée par certains auteurs (RIVES , 1958) . Cette situation peut encore être compliquée par la lenteur de l'établissement des symptômes . Pour s'assurer du parfait état sanitaire du matériel sélectionné , il conviendrait donc de l'observer et de le tester pendant plusieurs années et à chaque étape de sa multiplication .

Enfin , les observations faites sur la rhizogénèse suggèrent que les diverses techniques de multiplication végétative pourraient ^{jouer} des rôles très différents dans l'extension du court-noué . En culture in vitro , les plantes court-nouées incapables de s'enraciner sont rapidement éliminées au cours des bouturages . Les différences de rhizogénèse sont certainement moins nettes dans les conditions naturelles . Elles existent cependant et elles ont paru suffisantes pour servir de test de l'état sanitaire des boutures (WURGLER , 1955) . On peut donc se demander si la généralisation du bouturage avant l'invasion phylloxérique n'était pas un facteur naturel de sélection . A une époque où le mode de transmission et les symptômes du court-noué étaient peu connus, la suppression du bouturage et son remplacement par le greffage ont pu modifier totalement le rythme d'expansion de cette maladie chez les cépages de Vitis vinifera . Il serait certainement intéressant de rechercher quelle influence pouvaient avoir les anciennes pratiques culturales (bouturage et marcottage) sur l'état sanitaire des vignobles .

II - ACTION DE LA TEMPERATURE SUR LES RELATIONS HÔTES-VIRUS

Nous avons vu , au paragraphe précédent , qu'il n'est pas rare de rencontrer des zones sans virus chez une souche de vigne atteinte de court-noué . C'est à dire que , dans les conditions naturelles , les relations hôte-virus peuvent présenter des modalités très diverses . Il était naturel de penser que la température était un facteur susceptible d'agir sur les relations hôte-virus . (GALZY , 1961) . On a pu constater , en effet , que des cultures in vitro de bourgeons court-noués se comportaient comme des cultures saines lorsqu'elles étaient maintenues à 35°C . Ce traitement , prolongé pendant 3 mois , avait permis d'obtenir la disparition apparemment irréversible des symptômes du court-noué . On a donc cherché à préciser l'action de la température sur la croissance des boutures saines et virosées d'une part et sur l'expression des symptômes du court-noué , d'autre part . Cette étude a porté essentiellement sur un clone de Vitis rupestris présentant une forme grave de court-noué . Cependant on a pu constater que d'autres clones virosés se comportaient de façon analogue . L'ensemble de ce travail a conduit à la mise au point d'une méthode de traitement des clones virosés par thermothérapie .

A) ETUDE D'UN CLONE DE *VITIS RUPESTRIS* PRESENTANT UNE FORME GRAVE DE COURT-NOUE

Le matériel végétal utilisé tout au long de cette étude a été choisi parmi les quatre clones de *Vitis rupestris* décrits au tableau 2 . Les plantes malades appartenaient toujours au clone I Condamine conservé en culture in vitro à 20° et désigné par M 20 . Comme témoin sain , on a retenu , le plus souvent , le clone I.S.58 traité pendant 3 mois à 35°C et désigné par S.35 .

I) Croissance de *Vitis rupestris* sain et court-noué cultivé in vitro à différentes températures .

Des lots de boutures appartenant aux deux clones , sain et court-noué , ont été cultivés in vitro à différentes températures comprises entre + 2 et + 40°C . Dans chaque cas la croissance des boutures a été suivie en analysant l'émission des racines , la vitesse de croissance des racines et la vitesse de croissance des tiges . Ce travail a permis de comparer l'action de la température sur le développement et la croissance des boutures saines et virosées en déterminant notamment pour chaque phénomène étudié le Q_{10} et la température optimale .

Les graphiques rassemblés figure I7 résument l'essentiel des résultats obtenus . Cette étude a permis de faire des observations dans le domaine de la physiologie et dans celui de la pathologie (GALZY , 1969 a) .

a . Influence de la température sur la rhizogénèse in vitro des boutures saines et virosées .

Le phénomène de rhizogénèse constitue évidemment la phase essentielle de la multiplication végétative . Il en conditionne à lui seul la réussite . Nous avons constaté , dès le début de ce travail , que chez le clone malade étudié, la virose agissait de façon très nette sur la différenciation des racines . On pouvait donc penser que l'étude de la rhizogénèse apporterait des indications sur l'évolution de l'état pathologique des plantes .

I° - Pourcentage de boutures capables de s'enraciner (figure I7 A) .

Chez les plantes saines , le pourcentage de boutures enracinées reste à peu près constant et supérieur à 90 p. 100 pour une gamme de température assez

large (+ 15 à + 37°C) .

Chez les plantes malades , au contraire , la rhizogénèse reste faible aux températures 20 et 26°C . Elle atteint une valeur maximum pour les températures 33 , 35 et 37°C . Il semble que l'inhibition de la rhizogénèse par la virose commence à être levée entre 26 et 30° . En outre , il ressort très nettement de la figure 2 que le test d'enracinement in vitro à 20° permet de distinguer facilement les deux clones S.35 et M.20 .

2° - Vitesse moyenne d'émission des racines (figure I7 B) .

α - Boutures provenant d'un clone sain (S.35) .

Cas des températures comprises entre + 8 et + 38° .

La courbe obtenue dans le cas des plantes saines présente une forme générale classique . La température optimale , assez élevée , est de l'ordre de 33°C . Entre + 8 et 33°C la vitesse augmente progressivement avec la température . Entre 33 et 38° , la vitesse diminue au contraire très rapidement . La partie ascendante de la courbe semble correspondre assez bien à une variation exponentielle de la vitesse en fonction de la température . Le Q_{10} calculé entre + 15 et + 33°C est égal à 3 . Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles trouvées pour d'autres phénomènes biologiques .

Cas des températures extrêmes : + 8 , + 38 et + 39° .

Aucune racine n'est apparue sur les boutures placées à ces différentes températures . Cependant ces boutures étaient , pour la plupart , vivantes à la fin du séjour . Des lots de boutures S.35 ayant séjournés à 8 , 38 et 39° ont donc été placés ensuite à 20° et l'émission des racines a été comparée à celle de lots de boutures du même clone placés à 20° dès leur mise en culture . Cette expérimentation a permis de constater que la différenciation des racines était en cours avant le retour à 20° , chez une partie des boutures . Les séjours à 8 et 38° n'ont pas modifié le pourcentage final de boutures enracinées . Par contre , cette valeur a été diminuée d'environ 20 p. 100 après 10 jours à 39° . Ainsi la température 39° semble avoir permis la différenciation des racines chez une partie des boutures tout en provoquant la mort chez une autre partie . Etant donné l'intérêt de cette observation dans le cadre des essais de thérapie , une expérimentation spéciale a été réalisée pour tenter de préciser l'action des températures extrêmes sur la rhizogénèse . Des lots de boutures

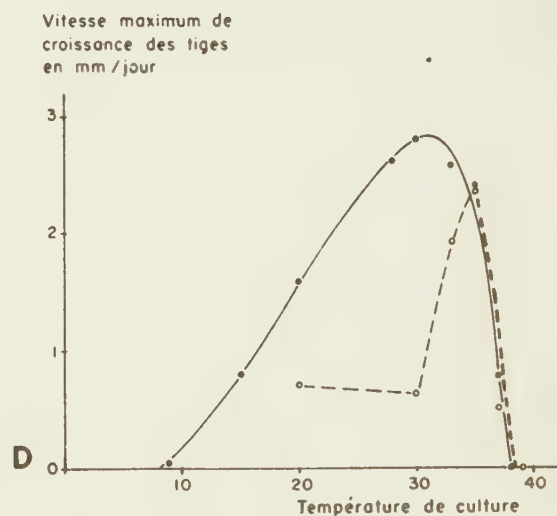
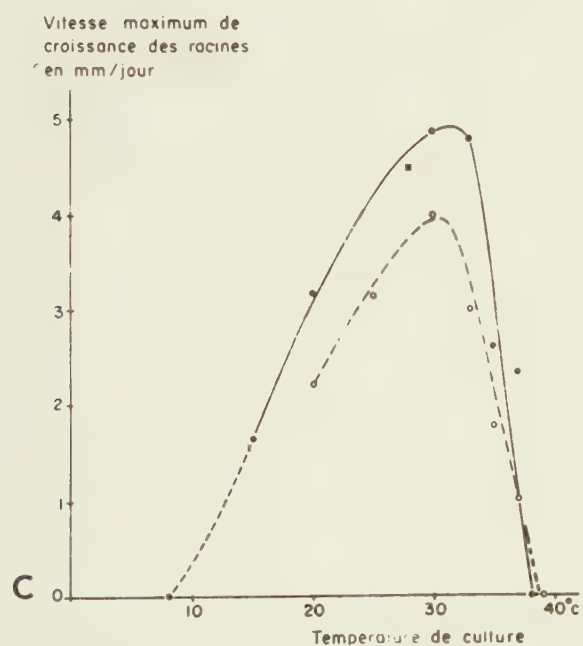
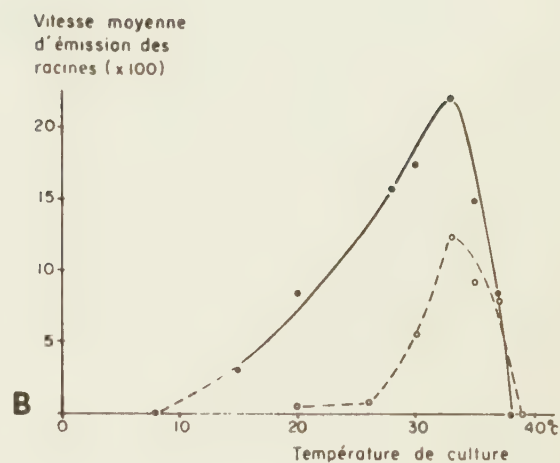
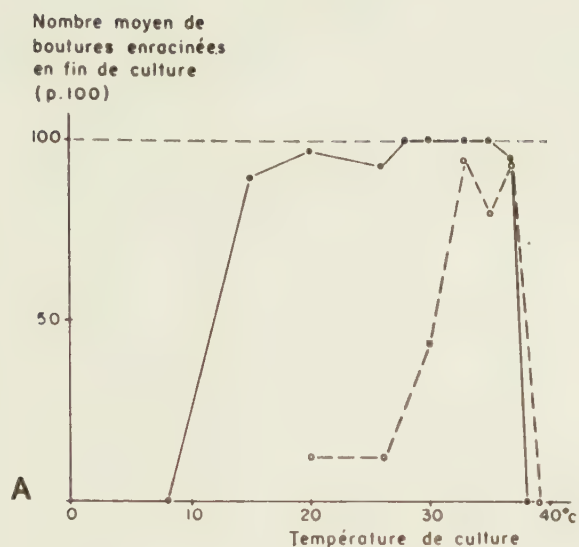


Fig. 17 - Etude de la rhizogénèse et de la croissance de boutures de *Vitis rupestris* cultivées *in vitro* à différentes températures.

● Clone sain S 35

○ Clone court-noué M 20

ont été placés , dès leur mise en culture , aux températures de 26 , 35 et 39°C , puis ramené à 20° après 1 , 2 , 3 , 5 et 10 jours . Le temps moyen d'émission des racines a été calculé et comparé au temps d'émission des racines (environ 12 jours) dans le cas d'une culture à 20° . Dans le cas de la température 39° , la différence entre le temps moyen à 20° et le temps moyen dans les conditions de l'expérience a toujours été négative et cette différence a augmenté plus vite en valeur absolue que la durée du séjour à 39° . Cette observation suggère que le séjour à 39° provoque , surtout au delà du 3ème jour , des dommages irréversibles qui vont en s'aggravant . La présentation graphique des résultats (figure I8) permet d'étudier de façon simple l'action des températures extrêmes sur les boutures cultivées in vitro . D'une façon générale , les températures à action dépressive devraient correspondre , sur la figure , à des points expérimentaux d'ordonnée négative et supérieure en valeur absolue à la durée du traitement préalable à la température étudiée . Le retard observé alors pour l'émission des racines serait en effet supérieur au temps de séjours à cette température , ce qui correspondrait à une détérioration des possibilités de rhizogénèse . Une étude de ce genre peut être utile à la mise au point d'une méthode de thérapie en permettant de déterminer avec une certaine précision la température la plus élevée supportée sans dommage par des plantes dans ces conditions de culture .

β - Boutures provenant d'un clone virosé (M.20) .

Les courbes représentant les variations de la vitesse moyenne d'émission des racines en fonction de la température sont très différentes pour les plantes saines et pour les plantes malades . Bien que la température la plus favorable soit la même pour les deux types de boutures (33°) , la vitesse d'émission reste très faible aux températures 20 et 26°C chez les boutures malades . Elle augmente ensuite rapidement jusqu'à 33° . Le Q_{10} calculé entre 26 et 33° est égal à 14 . Cette valeur est environ 5 fois supérieure à celle obtenue pour les plantes saines . L'élévation de la température agit donc d'une façon bien particulière sur les boutures malades : on peut penser qu'à partir d'une certaine température , il se produit en plus de l'action physiologique normale ($Q_{10}=3$) une levée de l'inhibition exercée par la virose sur la rhizogénèse . La levée partielle de l'inhibition que l'on observe à la température 35° est sans aucun doute un phénomène différent de la guérison . On doit noter , en effet , que les observations relatives à l'émission des racines sont généralement faites avant le 10ème jour de culture . Or , on sait qu'à 35°C aucune guérison défini-

Temps moyen à 20° T.m.
dans les conditions de
l'expérience (en jours)

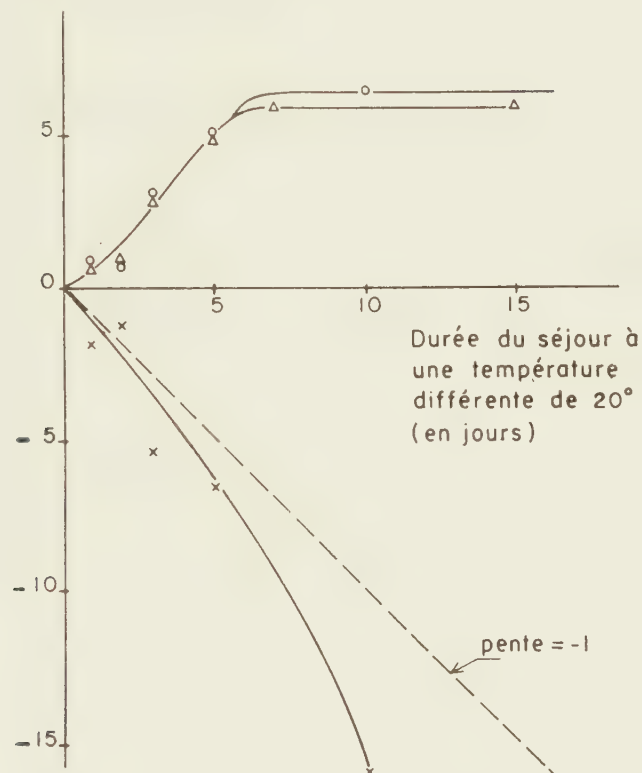


Fig. 18 - Essai de détermination des températures létales

Le phénomène étudié est le temps moyen d'émission des racines. En ordonnée est portée la différence entre le temps moyen d'émission des racines à 20° et le temps moyen obtenu lorsque les boutures sont préalablement placées, pour des temps variables, à une température différente de 20°. La durée de ce traitement est portée en abscisse.

- Traitement préalable à 26°
- △ Traitement préalable à 35°
- × Traitement préalable à 39°

tive n'a été observée à la suite de traitement d'aussi courte durée (voir chapitre suivant) . On peut faire l'hypothèse qu'un ou des gènes permettant la différenciation des racines se trouveraient réprimés chez les plantes virosées et que cette répression serait levée aux températures élevées , peut-être par suite de la disparition d'un répresseur sensible à la chaleur . On connaît en effet plusieurs cas où la synthèse d'un enzyme est soumise à l'action d'un répresseur thermo-sensible . (SADLER et NOVICK , 1965 - ESEIN et al. , 1968) .

b . Influence de la température sur la croissance in vitro des racines de plantes saines et virosées (figure I7 C) .

α - Boutures provenant d'un clone sain (S.35)

Chez les plantes saines , la vitesse de croissance des racines à 8° paraît être nulle ou tout au moins très faible . La vitesse de croissance la plus grande a été obtenue pour la température 30° . Il semble donc que la température optimum pour la croissance des racines soit légèrement inférieure à celle observée pour la vitesse d'émission . D'autre part , le coefficient de température calculé entre 20 et 30° est égal à 1,5 . Il est donc nettement plus faible que celui observé pour la vitesse d'émission des racines .

β - Boutures provenant d'un clone malade (M.20)

On peut considérer que la courbe obtenue pour les plantes malades présente une forme analogue à celle des témoins sains bien qu'aucune expérience n'ait été réalisée avec le clone M.20 aux températures les plus basses (8 et 15°) . En effet , la température optimale est la même pour les deux types de boutures . De plus , entre 20 et 35° , les vitesses de croissance des racines malades ne sont jamais inférieures à 60 p. 100 des vitesses correspondantes observées pour les plantes saines . Le α_{10} calculé pour les plantes malades , entre 20 et 30° , est égal à 1,9 . Cette valeur est légèrement supérieure à celle obtenue pour les plantes saines mais elle reste du même ordre de grandeur . L'élévation de la température n'agit donc pas de façon très différente sur la vitesse de croissance des racines saines et des racines malades . Ce résultat contraste avec celui du paragraphe précédent où l'on avait montré l'action particulièrement importante de la température sur la différenciation des racines nouvelles chez les boutures malades . On remarque qu'aux températures les plus basses (20° par exemple) ,

la virose n'exerce sur la croissance des racines qu'une action dépressive modérée alors qu'elle exerce un blocage presque total de la rhizogénèse . Cependant il faut noter qu'à ces températures les mesures de croissance n'ont porté que sur une faible proportion des boutures mises en culture . On sait en effet qu'à 20° , 9 p. 100 seulement des boutures malades sont capables de s'enraciner . On peut se demander si ces boutures là ne diffèrent pas de l'ensemble des lots par certains caractères pathologiques : teneur moins grande en virus par exemple.

c . Influence de la température sur la croissance in vitro des tiges de plantes saines et virosées (figure I7 D) .

α - Boutures provenant d'un clone sain (S.35)

- Vitesses de croissance observées aux températures comprises entre + 9 et + 37°

Les boutures saines de Vitis rupestris ont présenté une croissance mesurable aux diverses températures expérimentées entre + 9 et + 37° inclus . La courbe représentant les variations de la vitesse de croissance en fonction de la température , de forme classique , est ascendante entre + 9 et + 30° et rapidement descendante ensuite . La température la plus favorable à la croissance des tiges est à peu près la même que pour la croissance des racines . Entre 20 et 30° la vitesse de croissance augmente avec un O_{10} de 1,5 , valeur identique à celle trouvée pour la croissance des racines dans la même gamme de température . Quelques remarques peuvent être faites au sujet de la culture prolongée in vitro à 20°C . C'est à cette température que le matériel expérimental a toujours été conservé . Un clone de Vitis rupestris notamment (le clone S.20) mis en culture in vitro en 1959 a été maintenu dans ces conditions jusqu'en 1970 . Pendant cette période les plantes ont subi plus de trente bouturages stériles sans qu'on observe une diminution de la vitesse d'émission des racines ni des vitesses de croissance des racines et des tiges . Aucun phénomène de repos végétatif ne s'est manifesté dans ces conditions de culture et les bouturages ont pu se succéder à intervalles réguliers . On doit noter que ce mode de multiplication faisait intervenir des boutures comportant une feuille étalée, et prélevées soit à un niveau quelconque de la tige , soit en position terminale . Dans ce dernier cas l'apex de la tige poursuit sa croissance après le bouturage . Il a paru intéressant de préciser les possibilités réelles de survie d'un sommet végétatif dans les conditions de la culture in vitro à température constante et sous un éclairage

de 12 heures par jour . Des boutures terminales cultivées pendant trois mois à 20° ont donné des plantes dont la partie terminale a été prélevée et mise en culture dans un nouveau tube de milieu . La même opération répétée plusieurs fois de suite a permis de maintenir les sommets végétatifs en croissance continue pendant plus de 500 jours . Leur mort n'a pas été observée . Ce comportement est totalement différent de celui rencontré dans les conditions naturelles où , sous nos climats , la durée de vie du sommet végétatif n'excède pas 4 à 6 mois selon les variétés de vigne .

- Possibilité de conservation des boutures à basse température

La conservation d'un lot de plantes en culture in vitro à 20° exige un nouveau repiquage tous les quatre mois environ . Des essais de conservation à plus basse température ont donc été réalisés dans le but de réduire le nombre des manipulations .

Des lots de boutures maintenus d'abord sous éclairage à 20° pendant 24 ou 42 jours ont été ensuite placés dans des enceintes obscures réglées à + 2 , + 7 et + 9°C . La plupart des boutures placées à 2 et 7° n'ont pas survécu et la mort est survenue d'autant plus rapidement que les plantes étaient plus développées au début du stockage à basse température . A 9° , au contraire , l'ensemble du matériel végétal est resté vivant . Au cours d'une autre expérience , la conservation à 9°C a pu être prolongée pendant 250 jours . Transférées à 20°C sous éclairage , ces plantes ont repris immédiatement leur croissance et ont pu être multipliées . Une technique de ce genre pourrait être utile à la conservation in vitro de matériel expérimental ou de plantes traitées par thermothérapie .

β - Boutures provenant d'un clone malade (M.20)

La vitesse maximum de croissance des tiges est obtenue , dans le cas des plantes malades , pour la température 35° (figure 8) . La température optimum est donc nettement différente pour les deux types de plantes . La forme générale de la courbe d'action de la température est également très différente . A 20 et 30° la vitesse de croissance reste faible . Elle augmente ensuite très rapidement pour atteindre , à 35° , une valeur égale à celle observée pour les plantes saines . Entre 30 et 35° , le Q_{10} est égal à 10 pour les plantes malades , alors qu'il avait une valeur inférieure à l'unité pour les plantes saines . Le rapport des Q_{10} est donc particulièrement élevé , ce qui traduit une action très importante de l'élévation de la température sur la croissance des tiges malades . On observe ici une action des températures élevées plus nette encore que celle décrite pour

la vitesse

d'émission des racines . Il faut également noter que la gamme des températures actives dans les deux cas est légèrement différente et que les temps d'action de ces températures ne sont pas du tout les mêmes . En effet , les mesures de croissance des tiges ont porté sur la phase de croissance active qui se situe approximativement entre le 20ème et le 80ème jour de culture . Au contraire , la levée de l'inhibition de la rhizogénèse par le virus se produit à 35° , avant le 7ème jour . Les deux phénomènes sont donc bien différents et on peut penser que l'effet de la température sur la croissance des tiges est lié à l'élimination définitive du virus . Cette hypothèse pourra être confirmée par l'expérimentation réalisée à 35° et qui sera résumée au prochain paragraphe .

d . Conclusion .

L'étude réalisée ici démontre que l'infection chronique par une souche de court-noué très virulente modifie souvent de façon profonde le comportement des boutures de Vitis rupestris . A température égale , les vitesses de développement (rhizogénèse) et de croissance sont en général plus faibles chez les plantes malades . D'autre part , les courbes d'action de la température n'ont pas toujours , lorsque le matériel est virosé , la forme considérée comme classique . Ainsi , la vitesse moyenne d'émission des racines reste très faible aux températures inférieures à 26°C . Mais , lorsque la température dépasse cette valeur , l'effet de la virose s'atténue et la vitesse d'émission des racines augmente alors avec un Q_{10} anormalement élevé puisqu'il est de l'ordre de 14 . L'inhibition de la rhizogénèse par la virose se trouve alors levée en grande partie . Ce phénomène se produit entre le 1er et le 10ème jour d'exposition aux températures élevées .

On observe pour la vitesse de croissance des tiges un phénomène analogue bien qu'il corresponde à des temps d'action de la température beaucoup plus longs (20 à 80 jours) . La vitesse de croissance , d'abord très faible et peu sensible aux variations de la température jusqu'à 30°C , augmente ensuite très vite ($Q_{10} = 10$) pour atteindre , à 35° , une valeur égale à celle obtenue pour les plantes saines .

Enfin , en précisant le comportement des plantes aux températures élevées , ce travail apporte des indications indispensables pour réaliser , dans de bonnes conditions , des traitements par thermothérapie .

2 - Action de la température 35°C appliquée pendant des temps plus ou moins longs .

Nous avons vu , au paragraphe précédent , que la température 35° permet d'obtenir une vitesse de croissance égale pour les plantes saines et pour les plantes virosées appartenant au clone M.20 . On sait , d'autre part , que les plantes malades maintenues à cette température pendant 90 jours , ont été guéries . Il a donc paru nécessaire d'étudier les modalités de l'élimination du virus à cette température particulière . Des lots de boutures appartenant au clone malade M.20 et des lots de boutures témoins S.35 ont donc été placés à 35°C dès leur mise en culture et maintenus à cette température pendant des temps variables , compris entre 1 et 100 jours (GALZY , 1965 et 1966) . Pour l'exposé des résultats nous distinguerons les traitements courts (jusqu'à 21 jours) et les traitements longs (de 21 à 100 jours) .

a . Action de traitements thermiques courts .

Des lots de boutures court-nouées et des témoins sains ont été maintenus à 35° pendant 1 , 2 , 3 , 5 , 7 , 14 et 21 jours . Dans chaque expérience , deux tests utilisant chacun la moitié du matériel végétal , ont été réalisés pour mettre en évidence l'influence de la durée d'exposition à 35°C (figure I9) .

Le premier test consistait à placer directement à 20°C après la sortie de l'étuve la moitié des boutures de chaque lot . L'influence de la durée de séjour à 35°C était analysée en déterminant pour chaque lot le pourcentage de boutures capables de s'enraciner , c'est à dire présentant une ou plusieurs racines après 30 jours de culture . Les valeurs moyennes obtenues pour les divers temps de séjour préalable à 35°C sont présentées sur la figure I9 a . On constate que dans la plupart des cas les boutures saines traitées ou non à 35°C se sont enracinées (courbe A) . Au contraire , 6 p. 100 seulement des boutures malades se sont enracinées en l'absence de traitement thermique . Mais cette proportion a augmenté très rapidement et de façon régulière avec la durée du séjour à 35°C , jusqu'à 7 jours environ (courbe B) . De 7 à 21 jours , les pourcentages de boutures enracinées sont restés à peu près constants . Ils ont été en moyenne de 84 p. 100 . La culture à 35°C a donc modifié de façon importante les possibilités de rhizogénèse des boutures malades . On retrouve ici , comme au paragraphe précédent , la levée partielle de l'inhibition qu'exerce le virus sur la rhizogénèse . Il était néces-

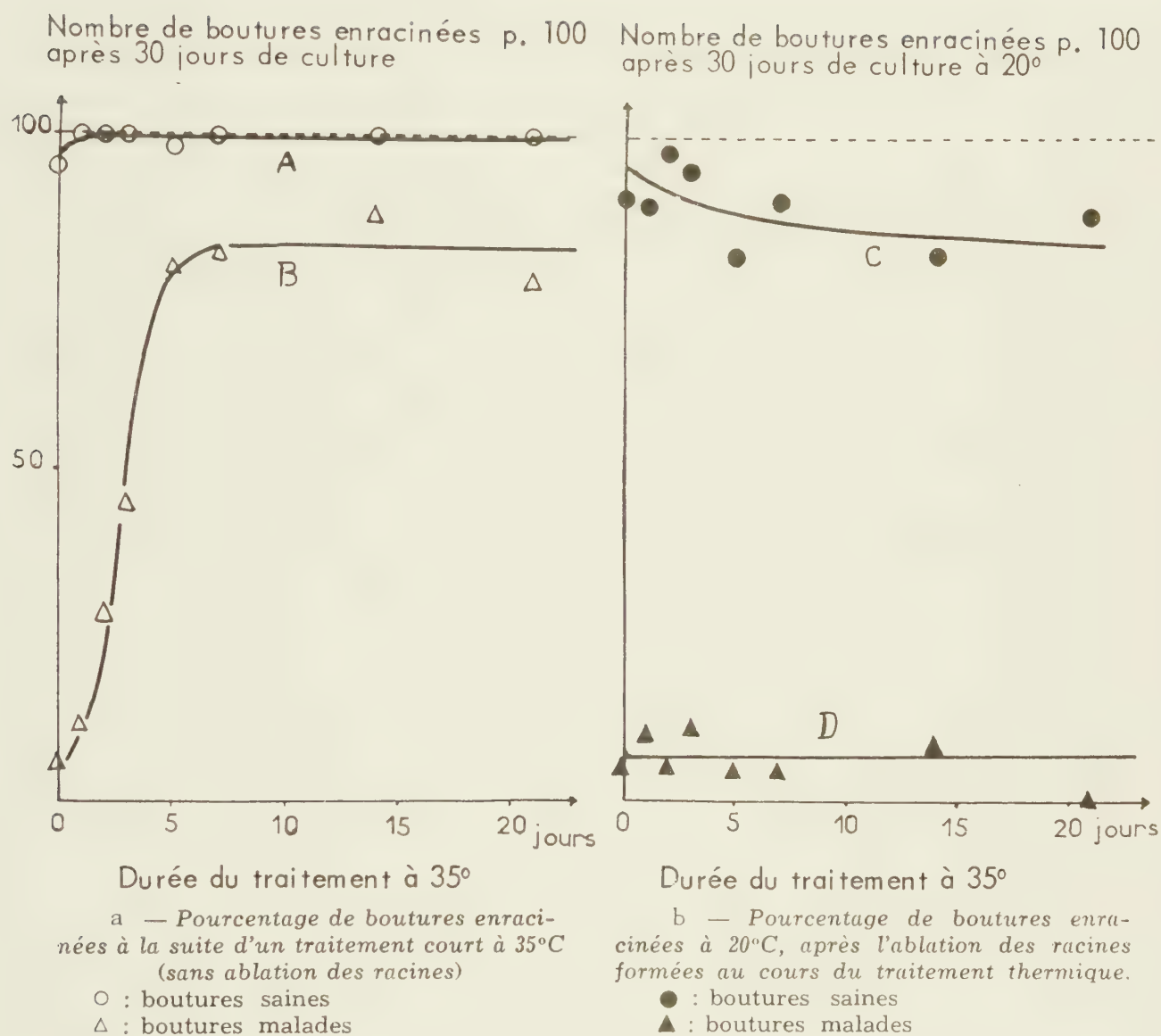


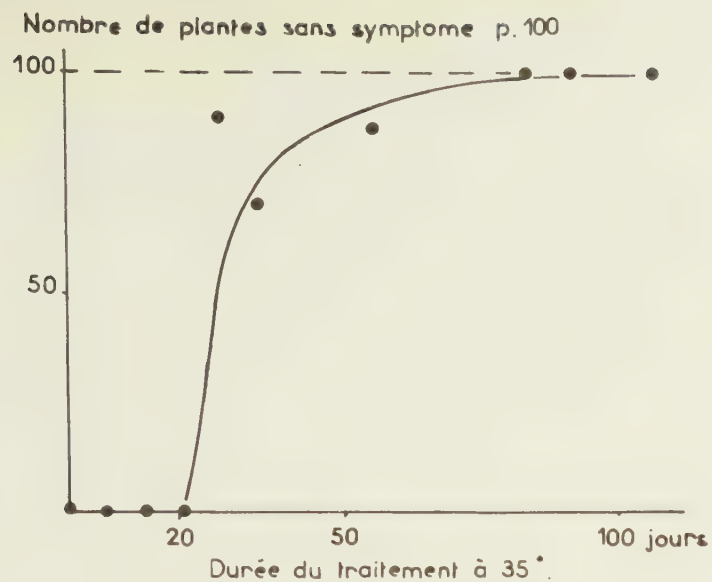
Fig. 19 - Influence de traitements courts à 35 °C sur l'enracinement in vitro des boutures de *Vitis rupestris* saines et court-nouées.

saire de préciser si ces traitements thermiques intervenaient d'une manière momentanée en permettant la rhizogénèse en présence du virus ou s'ils modifiaient de façon durable les propriétés de ce virus . C'est pourquoi un second test a été réalisé parallèlement au premier et suivant un protocole analogue .

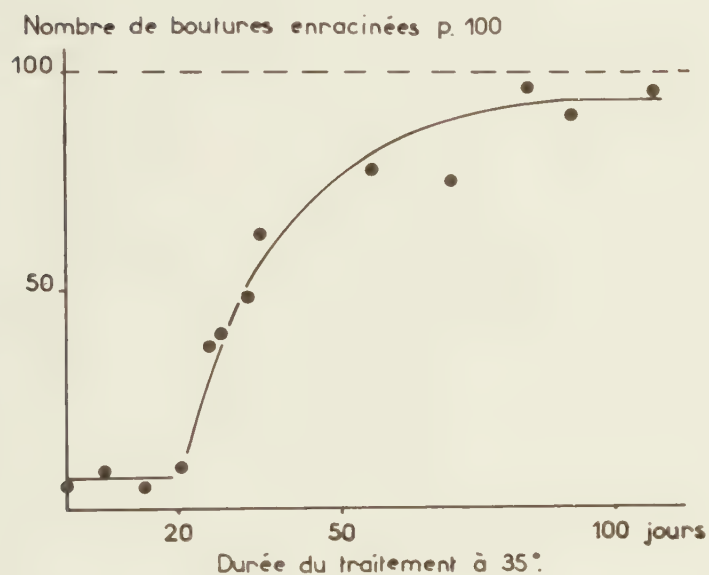
Ce deuxième test consistait à placer à 20°C des boutures de chaque lot après les avoir retaillées à leur partie inférieure de façon à supprimer les racines ou les ébauches de racines formées à 35°C . Le pourcentage de boutures capables de former de nouvelles racines à 20°C était ensuite noté . La moyenne des résultats obtenus est portée sur la figure I9 b en fonction de la durée du séjour préalable à 35°C . En ce qui concerne les plantes saines , il apparaît tout d'abord que 95 p. 100 des boutures témoins (non soumises à la température de 35°C) se sont enracinées . Par contre , chez les lots traités à 35°C , on observe , par comparaison avec la figure I9(courbe A) , une certaine action dépressive de l'ablation des racines formées pendant le séjour à 35°C . Cette action est d'autant plus marquée que le séjour a été plus long . Cependant , la rhizogénèse des plantes saines demeure importante puisque la proportion de boutures enracinées est comprise entre 80 et 97 p. 100 . Au contraire , les boutures malades cultivées uniquement à 20°C ne se sont enracinées que dans 4,5 % des cas . Or , les traitements thermiques préalables de I à 21 jours n'ont permis d'obtenir que de 0 à 12 p. 100 de boutures capables de donner des racines (courbe D) . A la suite de ces traitements , la possibilité de former des racines à 20°C n'est donc pas réapparue chez les plantes malades . Ces résultats permettent de penser que les traitements thermiques de moins de 21 jours ne provoquent pas l'élimination irréversible du virus et ne font que bloquer momentanément l'action de celui-ci sur la différenciation des racines . On doit souligner en effet que toutes les plantes malades traitées de I à 21 jours ont présenté , par la suite , les symptômes foliaires du court-noué aussi bien en culture in vitro à 20°C qu'après leur transfert à la culture en serre . Donc , la température de 35°C agissant pendant un temps court n'a apporté aucune modification durable à l'influence du virus sur la morphologie foliaire .

b . Action de traitements thermiques longs .

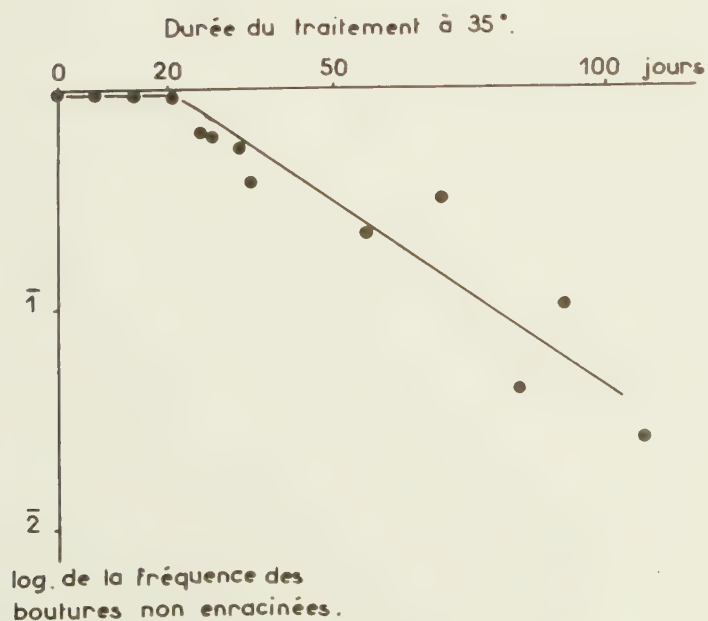
L'action de la température 35°C pendant des temps plus longs a été ensuite étudiée sur le même matériel et avec les mêmes techniques (Fig. 20) . Les temps de séjours à l'étuve ont varié entre 21 et 100 jours . Les boutures saines émettent toutes une ou plusieurs racines entre le 4ème et le 10ème jour de culture à 35°C puis le prompt-bourgeon situé à l'aisselle de leur feuille commence à se développer . Dans le cas des boutures malades , l'apparition des racines s'échelonne entre le



a - Evolution du nombre de plantes sans symptôme en fonction de la durée du traitement à 35°. Comptages faits deux ans après le traitement thermique sur des lots de plantes en pots.



b - Evolution de la rhizogénèse in vitro à 20° en fonction de la durée du traitement préalable à 35° C.



c - Résultats des tests de rhizogénèse effectués in vitro. Mêmes données pour la fig. 20 b, mais on a représenté ici, en fonction du temps de traitement, le logarithme de la fréquence des boutures non enracinées.

Fig. 20 - Etude de la guérison d'un clone court-noué de *Vitis rupestris* soumis à des traitements thermiques longs.

6ème et le 15ème jour mais le pourcentage final de boutures enracinées n'est en moyenne que de 85 p. 100 . A cette température , le prompt-bourgeon se développe en donnant une tige feuillée qui ne présente pas les symptômes du court-noué . Après le traitement thermique , les plantes sont ramenées à 20°C et deux tests différents sont réalisés pour mettre en évidence l'influence de la durée d'exposition à 35°C .

Le premier test consistait simplement à dénombrer pour chaque durée de traitements les plantes présentant les symptômes foliaires de court-noué. Afin d'être assuré du caractère définitif de la guérison , ce test a été réalisé 2 ans après le traitement thermique , sur des plantes en pots . Les résultats de ces comptages sont présentés sur la figure 20 a . Toutes les plantes malades conservées à 20°C ou traitées à 35°C pendant moins de 21 jours sont restées malades . Les traitements de 28 , 35 et 56 jours ont permis d'obtenir de 70 à 93 p. 100 de plantes ne présentant plus de symptôme . Enfin , la totalité des plantes qui s'étaient développées à 35°C pendant 84 , 92 et 107 jours ont été guéries .

Le second test avait pour but d'apprécier , chez le clone malade , le rétablissement de l'aptitude à la rhizogénèse à 20°C . Il a été réalisé in vitro dans les semaines qui ont suivi le traitement thermique . Les plantes qui s'étaient développées à 35°C ont été retaillées comme précédemment de façon à éliminer la partie inférieure de la tige portant les racines . Ces boutures ont été remises en culture à 20°C et après 30 jours , le pourcentage de boutures présentant au moins une racine a été noté . Mais , l'étiollement des plantes au cours des traitements thermiques longs rend parfois difficile la réalisation de ce test . C'est pourquoi , dans un grand nombre d'expériences , une technique différente a été utilisée . A la fin du traitement thermique , les plantes étaient retaillées au contraire de façon à ne conserver que leurs racines et la base de leur tige jusqu'au niveau de la première feuille . Placées à 20°C , ces plantes reprenaient leur croissance ; le prompt-bourgeon situé au niveau de la première feuille donnait une nouvelle tige . Après deux mois de croissance , cinq boutures à une feuille étaient prélevées sur chaque plante et mises en culture à 20°C sur de nouveaux tubes de milieu . Le test consistait donc à apprécier les possibilités de rhizogénèse sur les tissus formés à 20°C après le traitement thermique . Les deux méthodes ont donné des résultats très comparables . Les résultats de l'ensemble des tests réalisés ont donc été groupés pour présenter sur la figure 20 b l'évolution du pourcentage des plantes où la rhizogénèse est rétablie en fonction de la durée du traitement préalable à 35°C . Ces valeurs moyennes ont été établies à partir des résultats de 84 tests portant sur un total de 3479 boutures . Ces expériences ont permis de mettre en évidence un rétablissement progressif de la rhizogénèse au cours de traitements thermiques de plus en plus longs . Les cultures d'origine , conservées à 20°C , ont donné des

boutures qui ne s'enracinaient que dans 4 p. 100 des cas . Nous avons vu que les traitements de 7 , 14 et 21 jours ne modifiaient pas ce pourcentage . Au contraire, les traitements de 84 jours et plus ont permis d'obtenir une rhizogénèse identique à celle des boutures saines . Dans les mêmes conditions expérimentales , les plantes saines ont donné 90 à 100 p. 100 de boutures capables de s'enraciner , quelle que soit la durée du traitement thermique préalable . La moyenne a été de 94 p. 100 pour l'ensemble des boutures saines transférées à 20°C .

Les figures 20 a et b montrent que les deux tests permettent la même conclusion : le pourcentage de plantes guéries passe de 0 à 100 entre 21 et 84 jours . Il semble cependant que les tests réalisés in vitro conduisent à sous estimer le nombre de plantes guéries . La différence est probablement due au fait que certaines boutures pourtant prélevées sur des plantes guéries , ne se sont pas enracinées pour des raisons physiologiques . Malgré cet inconvénient et à défaut d'un test plus précis de l'état sanitaire , il a paru possible de considérer le test de rhizogénèse in vitro comme un test de guérison . Les résultats de ce test ont donc été utilisés pour tenter de construire une courbe de survie du virus à 35°C . On a porté le logarithme de la fréquence des boutures non enracinées en fonction de la durée du traitement thermique (Fig. 20 c) . Entre 0 et 21 jours la courbe est presque confondue avec l'axe des x puis elle s'infléchit . Pour la zone 21 - 100 jours , la déviation par rapport à une droite , n'est pas significative (point 1%) . Le graphique obtenu semble donc présenter l'aspect d'une courbe à plusieurs coups . Il se rapproche assez des courbes relatives à l'élimination par la chaleur du virus σ dans les ovogonies de la drosophile (BRUN , 1963) .

c . Conclusion .

On a pu constater de nouveau que la souche de virus du court-noué présente dans le matériel étudié , empêche l'initiation des racines chez les boutures de Vitis rupestris cultivées in vitro à 20°C et que cet effet du virus disparaît lors de la culture à 35°C . L'étude faite à cette température a permis de préciser que la levée de l'inhibition débute après 1 à 2 jours de culture à 35°C et atteint un maximum après 7 jours . D'autre part , cette action de la température est apparue comme réversible . En effet , pour des séjours à 35°C ne dépassant pas 21 jours l'inhibition de la rhizogénèse se manifeste de nouveau dès que les plantes sont ramenées à 20°C . Ce premier phénomène est donc bien différent de l'élimination définitive du virus par les traitements thermiques . Il pourrait être apparenté à la diminution du pouvoir pathogène observé pour d'autres virus lorsque leur hôte est placé à une température élevée (KUHN , 1965 - LEBEURIER et HIRTH ,

1964 - MATTHEWS et LYTTLETON , 1959) .

Des cas de guérison ont été observés à partir de 28 jours de traitement à 35°C . Pour obtenir la guérison de l'ensemble des boutures , il a été nécessaire de prolonger les traitements pendant 80 jours au moins .

B) ETUDE D'AUTRES CLONES VIROSES - APPLICATIONS AGRONOMIQUES .

L'effet curatif d'un traitement de 90 jours à 35°C a été vérifié pour d'autres clones de vigne virosés (GALZY et COMPAN , 1968) . Dans un premier temps , on a pu mettre en évidence le rétablissement de la rhizogénèse in vitro à la suite du traitement thermique . La figure 2I présente , sous forme de diagramme , les résultats obtenus pour 4 clones gravement atteints :

1) Vitis rupestris , var. du Lot , clone P. Condamine , présentant de la panachure et des déformations foliaires .

2) Vitis vinifera , var. Aramon , clone Condamine , présentant de la panachure et des déformations foliaires .

3) Hybride interspécifique , Aramon x Rupestris Ganzin n°9 présentant de la panachure et des déformations foliaires .

4) Vitis vinifera , var. Ugni blanc , clone n°9 présentant le symptôme de la laciniure .

Le traitement a provoqué , dans chaque cas , une augmentation importante de la rhizogénèse . La valeur atteinte est naturellement une caractéristique génétique de la variété . On remarque sur le diagramme que cette valeur est voisine de 95 p. 100 chez le clone de Vitis rupestris , de l'ordre de 40 p. 100 chez l'Aramon et qu'elle présente une valeur intermédiaire (75 p. 100) chez l'hybride interspécifique Aramon x Rupestris Ganzin n°9 .

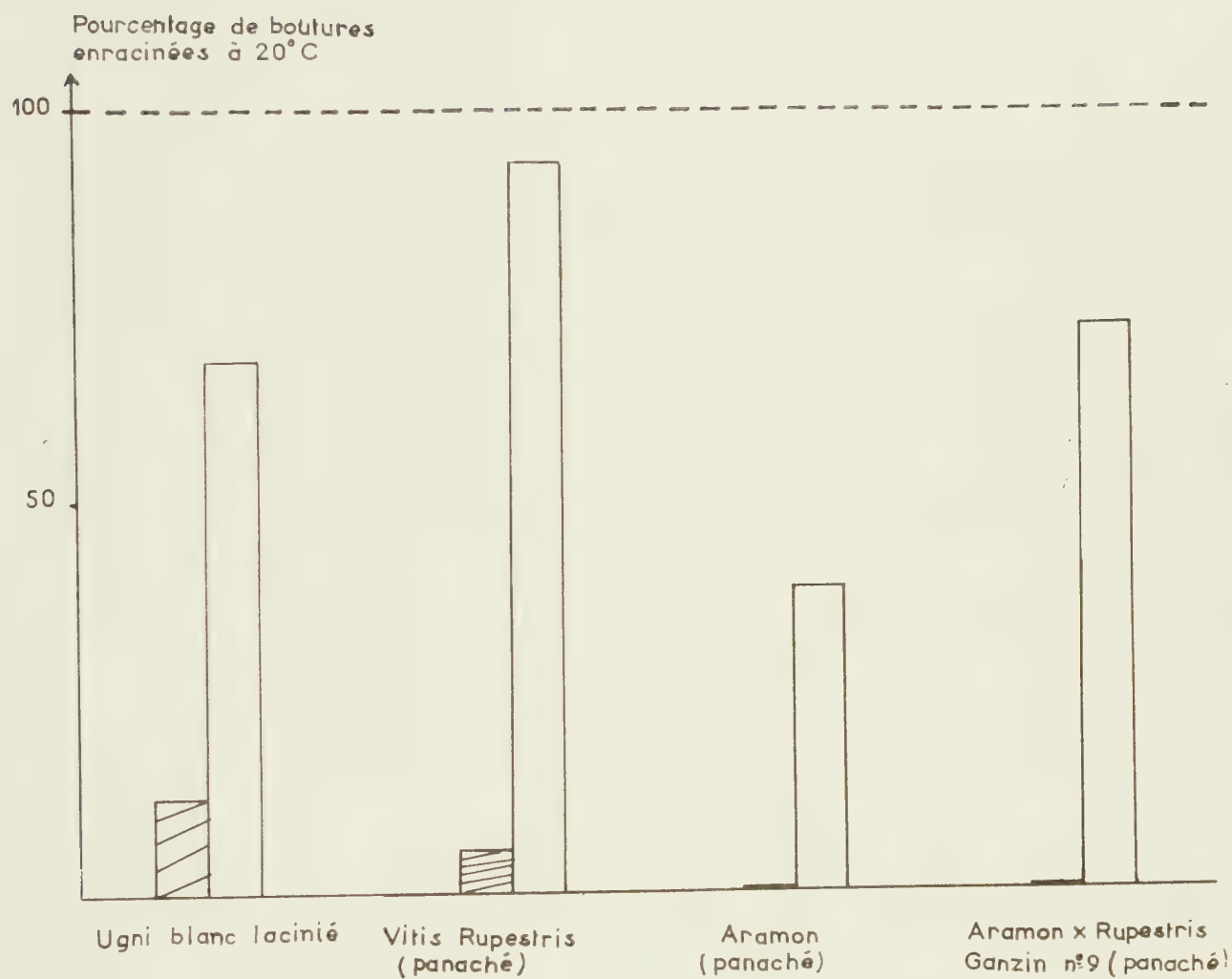


Fig. 21 - Rétablissement de la rhizogénèse à la suite d'un traitement thermique appliqué à 4 clones de vigne présentant des symptômes graves de virose. Pourcentage de boutures capables de s'enraciner in vitro à 20° C sur le milieu de référence avant le traitement (hachuré) et après le traitement (non hachuré).

On a également observé , dans tous les cas , la disparition complète des symptômes de virose : panachure , anomalies morphologiques diverses et laciniure de l'Ugni blanc (figure 22) . Les modifications acquises à la suite de la thermothérapie se sont montrées jusqu'à maintenant irréversibles , aussi bien en culture stérile qu'après le retour à la culture en conditions normales .

On peut citer par exemple l'expérience de comportement en plein champ réalisée dans le cas du Rupestris du Lot court-noué .

En 1965 , des boutures racinées ont été plantées au Domaine de Lavalette , 56 d'entre elles proviennent directement de la souche "I Condamine" et 84 ont été obtenues à partir de cultures in vitro ayant subi un traitement de 3 mois à 35°C . Les plantes traitées présentent chaque année des feuilles larges et de forme régulière alors que les témoins ont des feuilles très déformées (figure 23) . Cependant la différence la plus spectaculaire entre les deux parcelles réside dans la vigueur des plantes . En 1967 la longueur moyenne des rameaux en fin de croissance est de 35,6 cm pour les témoins malades et de 160,1 cm pour les plantes traitées . Un essai de bouturage a été réalisé pour le clone traité, à partir des rameaux développés la deuxième année de culture en plein champ . Sur 113 boutures plantées dans un terrain arrosable de Lavalette , 111 (soit 98 p. 100) se sont enracinées et développées . Les témoins malades n'ont pas encore pu être bouturés dans les mêmes conditions faute d'un développement suffisant . Mais on peut souligner que , pour l'ensemble des pépinières françaises , la reprise au bouturage du Rupestris du Lot est de l'ordre de 39 à 52 p. 100 (GALET , 1956) . Ces chiffres s'expliquent probablement par le mauvais état sanitaire du vignoble français . Le comportement en plein champ de l'hybride ^{Aramon} x Rupestris Ganzin n°9 a été également suivi . La comparaison des plantes témoins et des plantes traitées par thermothérapie fait ressortir une augmentation importante de la vigueur et la disparition totale des symptômes de panachure à la suite du traitement thermique .

L'ensemble des observations précédentes montre bien qu'il est possible d'obtenir la disparition irréversible des symptômes du court-noué en appliquant un traitement thermique à des boutures de vigne cultivées in vitro . Nous avons pu vérifier , d'autre part , qu'il est possible de cultiver in vitro , de multiplier par bouturage et de traiter à 35° un grand nombre de variétés de vigne . Actuellement notre collection comporte plus de trente variétés de vigne traitées par thermothérapie . Il s'agit de variétés de Vitis vinifera , Vitis rupestris



Fig. 22 - Deux plantes d'Ugni blanc provenant du même bourgeon prélevé sur une souche à feuilles laciniées.

A - plante témoin non traitée

B - plante traitée pendant 3 mois à 35° C.



Fig. 23 - Rameaux prélevés sur deux plantes appartenant à un même clone court-noué de *Vitis rupestris*.

A gauche, plante malade ,à droite, plante guérie par un traitement thermique.

et Vitis riparia ainsi que d'hybrides interspécifiques . Le pourcentage moyen de boutures capables de s'enraciner sur le milieu de référence à 20° est un caractère génétique des cépages . Pour des clones ayant subi un traitement thermique , ces valeurs peuvent être comprises entre 15 p. 100 (V. vinifera var. Alphonse Lavallée) et 100 p. 100 (V. riparia var. Gloire de Montpellier) . Cependant , certains cépages s'enracinent très difficilement lors de la mise en culture , mais par la suite leur rhizogénèse s'améliore puis se stabilise à une valeur maximum . Cette observation est valable notamment pour les hybrides de Vitis Berlandieri (I6I-49 , 4I B , IIO R) et pour quelques cépages de Vitis vinifera (Muscat d'Alexandrie , Muscat de Frontignan , Muscat de Hambourg , Ugni blanc) . Il semble que ce comportement soit lié à une modification de la physiologie de la plante lorsque celle-ci se développe en culture in vitro . Quoi qu'il en soit , il est intéressant de souligner que la culture in vitro permet une multiplication très efficace de porte-greffes comme le IIO R , dont la reprise au bouturage dans les conditions normales de culture serait de 10 à 15 p. 100 seulement (GALET , 1956) , alors qu'elle atteint 100 p. 100 en culture in vitro . Cette expérimentation a démontré que la thermothérapie des variétés de vigne virosées pourrait être réalisée à grande échelle dans le but de fournir aux producteurs du matériel végétal indemne de court-noué (GALZY , 1964 et 1968 a) . La méthode proposée peut être résumée de la façon suivante :

Les bourgeons prélevés sur la souche constituent un stock conservé à 20°C et sur lequel sont prélevées les boutures destinées à subir le traitement thermique . Ces boutures s'enracinent d'abord à 20°C puis elles sont maintenues pendant 3 mois à 35°C . Les étuves utilisées pour le traitement thermique ont été conçues spécialement pour ce travail . Elles consistent en une double enceinte de plexi-glas parcourue par deux circuits d'air pulsé dont la température est réglée par des thermomètres à contact de mercure . L'éclairage est apporté par quatre tubes fluorescents de 40 watts (GALZY et NIGOND , 1968) . A la suite du traitement thermique les plantes sont ramenées à 20°C pour subir une multiplication par bouturage en conditions stériles . Enfin , les boutures sont transférées à la culture en serre lorsqu'elles présentent 3 ou 4 feuilles et des racines bien développées . La transplantation réussit dans 90 p. 100 des cas . La période la plus favorable à la mise en pots est celle de Janvier à Avril . Il est donc nécessaire de disposer d'une serre chauffée et munie d'un éclairage d'appoint . Si la plantation est faite assez tôt , au début de l'année , les plantes donnent , au cours du premier cycle végétatif une tige aoûtée d'un mètre environ . La plupart d'entre elles peuvent donc être mises en pépinière au printemps suivant .

Cependant il est souhaitable de conserver en culture in vitro quelques exemplaires de chaque variété traitée par thermothérapie . On dispose ainsi d'une collection de vignes saines à l'abri des contaminations par le court-noué . On peut en effet maintenir les clones dans ces conditions de culture pendant de longues années grâce à des bouturages successifs . Rappelons qu'il est possible d'espacer les repiquages à condition de stocker les tubes de culture à 10°C environ . A tout moment un clone de la collection peut être multiplié rapidement par bouturage à 25°C par exemple et transféré à la culture en pots .

Une autre méthode de thermothérapie mise au point aux Etats-Unis a également permis d'obtenir la guérison de cépages atteints de court-noué (GOHEEN , LUHN et HEWITT , 1965) . Elle consiste à traiter à 37°C des plantes cultivées en pots . Les extrémités des rameaux développés à cette température sont prélevées et bouturées sous brouillard . En effet , dans ces conditions de culture , la température obtenue au niveau des racines reste généralement inférieure à celle de l'air . La culture in vitro permet d'éviter cette difficulté et d'obtenir la guérison de toute la plante . Elle se prête d'autre part à un contrôle plus rigoureux de la température . Enfin , la culture in vitro constitue une méthode pratique et peu onéreuse pour multiplier et pour stocker sous un faible volume un abondant matériel végétal .

CONCLUSIONS

Les techniques de culture in vitro d'organes ou de plantes entières sont très utilisées pour l'étude du métabolisme des végétaux . Il semble qu'elles permettent en réalité des observations différentes . La culture de tissus ou d'organes isolés peut conduire à localiser les lieux de synthèse ou de consommation des métabolites . La culture in vitro de plantes entières doit permettre de préciser les relations entre organes ainsi que l'évolution des besoins au cours de différentes phases du développement . La culture en milieu naturel ne fournirait pas à cet égard les mêmes possibilités car celui-ci , plus complexe , contient généralement tous les éléments nécessaires à la croissance et au développement de la plante . Ainsi , la présence dans la rhizosphère de vitamines produites par les microorganismes du sol , ne peut pas permettre d'apprécier exactement le degré d'autotrophie des plantes phototrophes . Il est évident que les plantes cultivées in vitro à température constante et sur un milieu nutritif

synthétique présentent souvent des caractères physiologiques très différents de ceux observés dans les conditions naturelles . Néanmoins , cette méthode de culture permet d'étudier différents problèmes de physiologie et de pathologie végétales . On ne doit pas sous-estimer non plus les possibilités d'applications pratiques qu'elles offrent .

Vitis rupestris cultivé in vitro a pu se développer entre les températures limites + 8 et + 38°C . Dans ces conditions de culture les plantes ont présenté une vitesse de croissance plus faible que dans la nature et , au contraire , une rhizogénèse plus rapide (du moins dans le cas des boutures indemnes de virus) . On a remarqué également l'absence de rythme endogène apparent et la croissance continue des sommets végétatifs . Enfin , cultivées sur milieu synthétique , les boutures de vigne comportant une feuille étalée , ne sont pas complètement autotrophes à tous les stades de leur croissance . La présence de sucre et de vitamines est nécessaire pour obtenir une croissance normale (notamment aux températures élevées) . Certains équilibres doivent d'ailleurs être respectés entre les éléments nutritifs du milieu . Ainsi , l'absence de vitamine se traduit par de graves nécroses et un arrêt brusque de la croissance des racines lorsque le milieu contient du saccharose , alors que ce phénomène n'est jamais observé en l'absence de sucre .

L'analyse systématique du développement des boutures a permis de déterminer certaines conditions de milieu et certains éléments nutritifs favorables à chaque stade de la culture : rhizogénèse , croissance des racines , croissance des tiges . A chacun de ces phénomènes correspondent en effet des besoins particuliers . Ainsi , la différenciation des racines admet une température optimale de 33°C et elle se trouve nettement favorisée par l'acide naphthalène acétique et par les concentrations élevées en cations monovalents K^+ et NH_4^+ . Au contraire , la croissance des tiges et celle des racines est maximale à 30°C seulement . Elle est , d'autre part , réduite en présence d'ANA ou de fortes concentrations de potassium et d'ammonium . Cette opposition entre les conditions qui favorisent la néoformation des racines et celles qui permettent la croissance s'accroît , lorsque l'on cultive des explantats prélevés à proximité du sommet végétatif . Ainsi , il a été possible de trouver un milieu nutritif capable d'assurer les différents stades de la croissance dans le cas de boutures comportant une feuille étalée . Par contre , dans le cas de boutures terminales à 2 ou 3 ébauches

foliaires , il a été nécessaire d'adopter un milieu différent pour chacun de ces stades . Il est possible , en quelque sorte , de remplacer pour de petits explantats , le gradient de différenciation qui existe le long de l'axe , par l'action de milieux nutritifs différents utilisés successivement . Si la composition et le temps d'action de ces milieux sont convenablement choisis , ils peuvent permettre d'induire l'une après l'autre , les différentes phases du développement des méristèmes . Il semble que des techniques de ce genre pourraient offrir d'importantes possibilités expérimentales pour l'étude des phénomènes de différenciation .

Enfin , la culture des méristèmes de vigne , telle que nous l'avons réalisée , doit permettre d'étudier la répartition du virus à proximité de l'apex . Sur le plan pratique , il s'avérerait qu'elle ne peut pas conduire à l'obtention de plantes indemnes de court-noué ; elle pourrait éventuellement être utile dans la lutte contre d'autres viroses de la vigne .

La culture in vitro de boutures de vigne saines et court-nouées a permis d'aborder l'étude de quelques aspects des relations hôte-virus . Les rapports de la vigne et du virus du court-noué paraissent très complexe . Plusieurs types d'explantats ont , en effet , été rencontrés à l'intérieur d'un même clone . Certains bourgeons se sont révélés être indemnes de virus . C'est à dire qu'une plante infectée de façon chronique peut porter des organes où le virus ne s'est pas multiplié .

En cultivant les boutures à diverses températures et en présence de doses variables d'ions K et NH_4 , nous avons également pu faire varier de façon considérable l'influence du virus sur la plante . On sait que le virus est capable de troubler les phénomènes de différenciation . Ainsi la néoformation des racines est presque totalement inhibée par certaines souches du virus du court-noué . Mais cette inhibition a pu être levée en grande partie par des traitements thermiques de courte durée et par des milieux riches en ions K^+ et NH_4^+ . Certains auteurs ont mis en évidence une diminution du pouvoir pathogène de plusieurs virus lorsque leur hôte est placé à une température élevée . Les traitements thermiques courts appliqués à la vigne pourraient , de la même façon , permettre le rétablissement de la rhizogénèse en modifiant les propriétés du virus . Cependant , on peut

également envisager , pour expliquer le rétablissement de la rhizogénèse , une action des températures élevées et des cations monovalents sur certains mécanismes de régulation de l'hôte . Rappelons que le virus agit de façon assez spécifique sur la différenciation des racines puisqu'il est capable de l'inhiber à 90 p. 100 , alors qu'il ne réduit la croissance que dans de plus faibles proportions . Il n'est pas impossible que le virus agisse en réprimant les gènes responsables de la différenciation des racines et qu'inversement , les températures élevées et les cations monovalents soient capables de lever ces inhibitions . Rappelons que ces derniers facteurs se sont également montrés actifs sur la différenciation des racines dans le cas des tissus sains (boutures et surtout apex) . Il serait particulièrement intéressant de pouvoir préciser le rôle joué par les températures élevées et les cations monovalents dans les phénomènes de différenciation cellulaire . Il serait important notamment de comprendre par quel mécanisme ces facteurs pourraient agir , au niveau moléculaire , pour induire la dérégulation des gènes .

Enfin , l'action de la température 35°C , lorsqu'elle se prolonge au delà de 21 jours , permet d'obtenir la disparition irréversible du virus . Toutes les boutures qui s'enracinent et poussent à 35° sont débarrassées du virus , pourvu que le traitement se prolonge pendant plus de 80 jours . La cinétique de la guérison semble correspondre à une "courbe à plusieurs coups" . Il aurait été intéressant d'étudier également l'évolution de l'état pathologique des boutures incapables de s'enraciner (15 % des lots environ) .

Au cours de ce travail , se sont également dégagées plusieurs possibilités d'applications agronomiques . Certaines d'entre-elles sont dès maintenant au point et elles peuvent contribuer efficacement à la lutte contre les viroses de la vigne . Il s'agit de la guérison des clones court-noués , par thermothérapie ou par culture de bourgeons sans virus , et aussi de la multiplication des plantes saines en culture in vitro .

D'autre part , la culture in vitro de bourgeons de vigne , ou d'autres plantes cultivées , en facilitant l'étude de certains phénomènes de différenciation pourrait conduire à de nouvelles applications agronomiques . On peut souligner par exemple l'importance pratique que pourrait présenter , pour la culture des plantes à reproduction végétative , une étude plus approfondie des inducteurs de la rhizogénèse .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARNAUD G. et ARNAUD M. , 1931 . Traité de pathologie végétale . Vigne : court-noué et roncet I , 611-630 .
- BRANAS J. , 1948 . La dégénérescence infectieuse de la vigne est une maladie à virus . C. R. Acad. Agric. France 34 , 301-302 .
- BRUN G. , 1963 . Etude d'une association du virus σ et de son hôte , la drosophile : l'état stabilisé . Thèse 255 p.
- CADMAN C.H. , DIAS H.F. , HARRISON B.D. , 1960 . Sap-transmissible viruses associated with diseases of grape vines in Europe and North America . Nature 4737 , 577-579 .
- CAUDWELL A. , 1965 . Bibliographie des viroses de la vigne des origines à 1965 . Off. Inter. Vigne Vin - PARIS .
- CHAUSSAT R. , 1968 . Action particulière du potassium sur la croissance et la morphologie des plantules étiolées de blé . Ann. Physiol. Vég. 10 , 5-16 .
- COSMO I. , PIERI G. , 1953 . Indagini sulla degenerazione infettiva della vite . Atti. Accad. Ital. Vite e Vino 5 , 401-445 .
- EISEN H. , PEREIRA DA SILVA L. , JACOB F. , 1968 . Sur la régulation précoce du bacteriophage λ . C. R. Acad. Sci. , 266 D , II , 1176-1178 .
- GALET P. , 1956 . Cépages et vignobles de France . Tome I .
- GALZY R. , 1961 . Confirmation de la nature virale du court-noué de la vigne par des essais de thermothérapie sur des cultures in vitro . C. R. Acad. Sci. 253 , 706-708 .
- GALZY R. , 1963 . Essais de thermothérapie du court-noué de la vigne sur des cultures in vitro . 3^e Conférence Internationale et mal. à virus de la vigne . LISBONNE , 1962 Bull. O.I.V. 36 , 41-44 .
- GALZY R. , 1963 . Thermothérapie de quelques variétés de vigne . Progr. Agric. Vitic. , 160 , 255-261 , 292-297 .
- GALZY R. , 1964 a . Technique de thermothérapie des viroses de la vigne . Ann. Epiphyties , 15 , (3) , 245, 256 .
- GALZY R. . 1964 b . Premières observations sur la distribution de l'infection chez des souches de vigne atteintes de court-noué . C. R. Acad. Sci. , 259 , 1761-1763 .

- GALZY R. , 1965 a . Action de traitements thermiques courts sur la rhizogénèse in vitro d'un clone de Vitis rupestris court-noué . C. R. Acad. Sci. 261 , 524-527 .
- GALZY R. , 1965 b . Observations sur les variations de l'état sanitaire à l'intérieur d'un clone de Vitis rupestris court-noué . Ann. Epiph. I6 , n°H.S. , I , 97-I08 .
- GALZY R. , 1966 . Action de la température 35°C sur Vitis rupestris atteint de court-noué . Bull. Soc. fr. Physiol. Vég. , I2 , 392-399 .
- GALZY R. , 1969 a . Recherches sur la croissance de Vitis rupestris SCHEELE sain et court-noué cultivé in vitro à différentes températures . Ann. Phytopath. I , I49-I66 .
- GALZY R. , 1969 b . Remarques sur la croissance de Vitis rupestris cultivé in vitro sur différents milieux nutritifs . Vitis 8 , I9I-205 .
- GALZY R. , 1970 . Culture in vitro de boutures terminales de Vitis rupestris comportant ou non une feuille étalée . A paraître . Ann. Physiol. Vég. .
- GALZY R. , COMPAN H. , 1968 . Thermo-thérapie de quelques variétés de vigne présentant des symptômes de viroses . Vignes et Vins , I66 , I3-20 .
- GALZY R. , GALZY P. , 1964 . Action de la température sur la panachure blanche de la vigne . Progr. Agric. Vitic. I62 , (24) , 27I-280 .
- GALZY R. , NIGOND J. , 1968 . Description d'une enceinte éclairée et thermostatée destinée à la culture in vitro des végétaux supérieurs . Vignes et Vins , I68 , II-I3 .
- GIFFORD E.N. , HEWITT W.B. , 196I . The use of heat therapy and in vitro shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the Grapevine . Am. J. Enol. Vitic. I2 , 3 : I29-I30 .
- GOHEEN A.C. , LUHN C.F. , HEWITT W.B. , 1965 . Inactivation of grapevine viruses in vivo . Proc. Int. Conf. on Virus and Vector on Perennial hosts . Davis Calif. 255-265 .
- HACKETT D.P. , THIMANN K.V. , 1952 . The action of the auxin - induced water uptake by potato tissue . Amer. Jour. Bot. , 39 , 553-560 .
- HEWITT W.B. , 1945 . A graft transmissible disease of grapevine . Phytopathol. 35 (II) , 940-942 .
- HEWITT W.B. , 1968 . Viruses and virus diseases of the grapevine . Rev. Appl. Mycol. 47 (9) , 433-455 .

- HEWITT W.B. , RASKI D.J. , GOHEEN A.C. , 1958 . Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines . *Phytopath.* 48 (II) , 586-595 .
- HEWITT W.B. , TAYLOR R.H. , 1963 . Serological relationships of virus isolates from grapevines with different disease symptoms . (Abst.) *Phytopath.* 53 , (8) , 878 .
- HOLLINGS M. , 1965 . Disease control through virus-free stock . *Ann. Rev. Phytopath.* 3 , 367-396 .
- HOLMES F.O. , 1955 . Elimination of spotted-wilt from dahlias by propagation of tip cuttings . *Phytopath.* , 45 , 224-226 .
- KASSANIS B. , 1963 . Interactions of virus in plants . *Adv. Virus Research.* , 10 , 219-255 .
- KROEGER H. , 1963 . Chemical nature of the system controlling gene activities in insect cells . *Nature* , 200 , 1234-1235 .
- KUHN C.W. , 1965 . Decline of specific infectivity of Cowpea Chlorotic Mottle virus in vivo . *Virology* , 25 , 9-14 .
- KUNKEL L.O. , 1939 . Movement of tobacco mosaic virus in tomato plants . *Phytopath.* , 29 , 684-700 .
- LANGRIDGE J. , McWILLIAM J.R. , 1967 . Heat responses of higher plants . In : *Thermobiology* , Acad. Press , New York , p. 272-275 .
- LEBEURIER G. , HIRTH L. , 1964 . Action des températures supraoptimales sur la multiplication du virus de la mosaïque du Tabac dans des disques de feuilles disposées en milieu liquide . Etude des propriétés des virions . C. R. Acad. Sci. , 259 , 2563-2566 .
- LIMASSET P. , CORNUET P. , 1950 . Etude de la corrélation entre l'âge des organes aériens et la quantité de virus contenue dans ces derniers chez le tabac infecté par le virus de la mosaïque du tabac (Marmor tabaci (ORTON) HOLMES). *Ann. Epiphyties* , I , 274-285 .
- L'HERITIER Ph. , 1958 . The hereditary virus of Drosophile . *Adv. Virus Research* 5 , 195-245 .
- LWOFF A. , LWOFF M. , 1958 . L'inhibition du développement du virus poliomyélitique à 39° et le problème du rôle de l'hyperthermie dans l'évolution des infections virales . C. R. Acad. Sc. 246 , I , 190-192 .

- MARAMOROSCH K. , 1949 . Occurrence of virus-free cuttings from sweet clover infected with wound -tumeur virus . Plant. Dis. Rep. , 33 , 145 .
- MATTHEWS R.E.F. , LYTTLETON J.W. , 1959 . Heat inactivation of Turnip yellow mosaic virus in vivo . Virology , 9 , 332-342 .
- MOREL G. , 1948 . Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux . Ann. Epiph. , 14 , I-II2 .
- MOREL G. , 1964 . La culture in vitro du méristème apical . Rev. Cytol. Biol. Vég. , 27 , 307-314 .
- MOREL G. , MARTIN C. , 1952 . Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus . C. R. Acad. Sci. 235 , 1324-1325 .
- MOREL G. , MULLER J.F. , 1964 . La culture in vitro du méristème apical de la pomme de terre . C. R. Acad. Sc. 258 , 5250-5252 .
- NIGOND J. , 1967 . Recherches sur la dormance des bourgeons de la vigne . Thèse . Paris . I.N.R.A.
- NYLAND G. , GOHEEN A.C. , 1969 . Heat therapy of virus diseases of perennial plants . Ann. Rev. Phytopath. 7 , 331-354 .
- PANTANELLI E. , 1911 . Roncet . Viticoltura Moderna 17 , 311-324 , 348-360 , 379-386 .
- PETRI L. , 1911 . Ricerche istologiche sopra le viti affette da rachitismo . Rend. R. Acad. Lincei. 20 , S.V. , 155-160 .
- PETRI L. , 1931 . Sull' "arricciamento" della vite . Boll. R. Staz. Pat. Veg. N.S. II , 61-83 .
- QUAK F. , 1957 . Meristem culture combined with heat treatments in order to obtain virus free carnation plants . Tijdschrift over Plante-ziekten 63 , 13-14 .
- RATHAY E. , 1882 . Die gabler oder Zwiewipflerleben . Osterr. Botan. Z. 32 , 316-320 .
- RAVAZ L. , 1900 . Le court-noué (Premier mémoire) Ann. Ecole Nat. Agr. Montpellier II , 294-314 .
- RAVAZ L. , 1928 . Recherches sur le court-noué . Progr. Agric. Vitic. 27 , 5-II et 29 , 53-63 .
- RIVES M. , 1958 . Une expérience de sélection clonale : l'amélioration variétale du Chasselas de Moissac . Proc. 15th Intern. Hort. Congr. , II , 92-95 .

- SADLER J.R. , NOVICK A. , 1965 . The properties of repressor and the kinetics of its action . J. Mol. Biol. 12 , 305-327 .
- SAMPATH A. , LUTZ A. , HIRTH L. , 1966 . Origine de la faible teneur en virus de la Mosaïque des cultures de tissus de tabac . Bull. Soc. Physiol. Véget. 12 , 273-283 .
- SELA I. et al. , 1964 . Separation of a highly active antiviral factor from virus infected plants . Virology 22 , 446-451 .
- STOWE B.B. , YAMAKI T. , 1957 . The history and physiological action of gibberellins . Ann. Rev. Plant. Physiol. 8 , 181-216 .
- VUITTENEZ A. , 1952 . Transmission par double greffage d'une panachure infectieuse de la vigne . C. R. Acad. Sc. 234 , 1084-1086 .
- VUITTENEZ A. , 1963 . Isolement , propriétés physiques et sérologiques du virus de la dégénérescence infectieuse chez les chénopodes de la vigne . Virologie Appliquée , I.N.R.A. , Station Centrale de Pathologie Végétale Versailles , n°4 , 133-142 .
- VUITTENEZ A. , KUSZALA J. , 1968 . Etudes sur l'extraction du virus du court-noué à partir de tissus de vigne . Ann. Epiph. 19 H.S. , 197-217 .
- WRIGHT S.T.C. , 1968 . Multiple and sequential roles of plant growth regulators . Proceed. 6th Intern. Conf. Plant. Growth subst. Ottawa , 521-542 .
- WURGLER W. , 1955 . La bouture de Vitis comme test biologique . Actes Soc. Helvet. Sci. Nat. 135 , 134-135 .

Série : E

N° : 131

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

(Décret n° 67-750 du 29 Août 1967)

Clermont-Ferrand, le 22 Juin 1970.



Doyen,

M. Muller
SOHLMULLER.

